

Der Einfluß von Ovarialhormonen auf Enzyme endokriner Organe

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

LANE MEDICAL LIBRARY OF
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR
PALO ALTO, CALIFORNIA

vorgelegt von
Gertraude Kähling
aus Freiberg/Sa.

1964



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153517_0180

Aus der Universitäts-Frauenklinik Tübingen

Direktor: Professor Dr. med. Hans Roemer

Der Einfluß von Ovarialhormonen auf Enzyme endokriner Organe

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Gertraude Kähling

aus Freiberg/Sa.

1964

Dekan: Professor Dr. med. H. HARMS

1. Berichterstatter: Dozent Dr. med. G. JUNG

2. Berichterstatter: Professor Dr. med. H. ROEMER

Meinen Eltern gewidmet.

Mein besonderer Dank gilt
Herrn Dozenten Dr. med. G. J u n g ,
in dessen Händen die wissenschaftliche Betreuung
dieser Arbeit lag.

Für die Ausführung der Stickstoffbestimmungen
möchte ich Fräulein Christiane W i d e m a n n
meine Anerkennung aussprechen.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
A. Einleitung	1
B. Fermente und Hormone	2
1.) Kurze Charakteristik von Fermenten und Hormonen	2
2.) Beeinflußbarkeit von Proteasen und Phosphatasen	4
3.) Enzyme in den zu untersuchenden Organen	5
4.) Hormonwirkung auf den Stoffwechsel	6
5.) Steroidhormone und ihre Wirkung in vitro	7
C. Der Einfluß von Ovarialhormonen auf Enzyme	10
1.) Kathepsin	10
2.) Saure Phosphatase	11
3.) Alkalische Phosphatase	12
D. Eigene Untersuchungen	15
I. Methodik	15
1.) Herstellung der Substratlösungen	15
2.) Hormonzusätze	15
3.) Nachweis der proteolytischen Fermentaktivität	15
4.) Bestimmung der sauren Phosphatase	18
5.) Bestimmung der alkalischen Phosphatase	19
6.) Stickstoffbestimmung und Berechnung	21
II. Untersuchungsergebnisse	22
1.) Kathepsin	22
a) Vorarbeiten	22
b) Ergebnisse	24
c) Auswertung	30
2.) Saure Phosphatase	32
a) Vorarbeiten	32
b) Ergebnisse	34
c) Auswertung	40
3.) Alkalische Phosphatase	42
a) Vorarbeiten	42
b) Ergebnisse	44
c) Auswertung	50
E. Diskussion	53
F. Zusammenfassung	56
Literaturverzeichnis	57

A. E I N L E I T U N G

Nachdem Einwirkungen von Steroidhormonen auf Endopeptidasen des Ovars von JUNG und KEMMLER (28, 29) untersucht worden sind, interessierte auch die Einwirkung von Ovarialhormonen auf Endopeptidasen und andere Enzyme in anderen endokrinen Organen.

Wir wählten Hoden (Bulle), Nebenniere und Hypophyse (Schwein), um fermentative Untersuchungen im Hinblick auf die innersekretorische Beeinflussung durchzuführen.

Unsere Aufgabe war es, zu prüfen, ob und wie bei Zusatz von Ovarialhormonen in verschiedenen Konzentrationen die Enzymaktivität von Proteasen und Phosphatasen in den einzelnen obengenannten Organen beeinflusst wird.

Ehe wir auf die eigenen Untersuchungen eingehen, soll aus der Literatur kurz das Wesentliche über Fermente, speziell über die Gewebsproteinase Kathepsin und die unspezifischen Phosphatasen zusammengestellt werden. Da sich die Arbeit mit dem Einfluß von Hormonen auf bestimmte Enzyme beschäftigt, wird auch allgemein über diese und ihre Beziehungen zu Fermenten berichtet werden.

Außerdem soll ein Überblick über die bisherigen Ergebnisse beim Einfluß von Östrogenen und Progesteron auf die uns interessierenden Enzyme gegeben werden.

B . F E R M E N T E U N D H O R M O N E

1.) Kurze Charakteristik von Fermenten und Hormonen

In der physiologischen Chemie unterscheidet man Baustoffe, Betriebsstoffe und Wirkstoffe. Zu den letzteren zählen die Fermente, die Hormone und die Vitamine, die alle zusammen auch als Ergone bezeichnet werden. Darunter versteht man organische Verbindungen, die in der lebenden Zelle gebildet werden und für den normalen Ablauf der Lebensvorgänge notwendig sind. Allen ist gemeinsam, daß sie eine hohe Wirksamkeit im Vergleich zu ihrer Masse haben.

Ursache des raschen Umsatzes der Nahrungsstoffe im Körper sind die Fermente oder Enzyme. Ihre Wirkung entspricht der von Katalysatoren. Die Katalyse besteht nach BERZELIUS in einer Reaktionsauslösung, während OSTWALD sie als Reaktionsbeschleunigung definierte. Im Gegensatz zu den Katalysatoren der analytischen Chemie werden die Enzyme als Biokatalysatoren definiert.

Ausmaß und Geschwindigkeit einer Fermentwirkung sind abhängig von der einwirkenden Fermentmenge, von der Substratkonzentration, von der Temperatur, von der Wasserstoffionenkonzentration und von bestimmten, sich im Reaktionsgemisch befindenden Effektoren. In der Regel schließt man auf eine Enzymreaktion aus dem Schwund des Substrats oder aus der Anhäufung der Spaltprodukte. Eine Einteilung der Fermente erfolgt nach ihrer Wirkung.

Die Enzyme sind weitgehend spezifiziert, d. h., sie haben eine bestimmte Wirkung und sind an ein bestimmtes Substrat gebunden. Häufig findet man auch eine gewisse Organspezifität. Im Gegensatz zu den Hormonen wirken sie an ihrer Bildungsstätte und sind an ihr Organ gebunden. Sie sind also nur an Stellen anzutreffen, wo sie eine physiologische Wirkung haben.

Ihrer chemischen Natur nach sind Fermente kolloide Substanzen. Man unterscheidet Proteine und Proteide. Für den Bau der Fermentproteide existiert die sogenannte Trägertheorie, die besagt, daß ein Ferment aus einem hochmolekularen Träger, einem spezifischen Protein, und einer niedermolekularen aktiven Gruppe, der prosthetischen Gruppe, die nicht eiweißartiger Natur ist, besteht. Nach EULER bezeichnet

man den Träger auch als Apoferment, die prosthetische Gruppe als Co-Ferment oder Co-Enzym und das ganze als Holoferment.

Das Apoferment ist verantwortlich für die Substratspezifität, das Co-Ferment für die Wirkungsspezifität. Ein Trägerwechsel ist möglich, und immer ergibt ein solcher eine Änderung der Spezifität, woraus sich die Vielzahl der Wirkungen in der Zelle erklärt.

Der Wirkungsmechanismus wird folgendermaßen erklärt: Erst nach Zufuhr einer gewissen Aktivierungsenergie ist es möglich, daß zwei Moleküle miteinander reagieren. Die Wirkung der Fermente besteht darin, diese Aktivierungsenergie zu verringern. Da die Enzyme selbst bei der Reaktion nicht verbraucht werden, nimmt man eine labile Ferment-Substrat-Verbindung an, durch welche die Aktivierungsenergie herabgesetzt wird, so daß die Zwischenverbindung leichter zerfällt als das Substrat allein.

Der Körper muß Regulationssysteme besitzen, damit die Tätigkeit der einzelnen Organe zu einer funktionellen Einheit zusammengefaßt wird. Teils geschieht diese Regulation nerval, teils humoral, d. h. durch Wirkstoffe, die, von besonderen Organen gebildet, von den Zellen unmittelbar an den Blutkreislauf abgegeben werden und durch Fernwirkung die Organe beeinflussen (33). CLAUDE BERNARD prägte hierfür den Begriff der inneren Sekretion.

BAYLISS und STARLING bezeichnen Stoffe, die im Körper selbst gebildet werden und sich durch eine hohe spezifisch-biologische Wirkung auszeichnen, als Hormone oder Inkrete. Alle Hormone, die man bis jetzt isolieren konnte, sind entweder Proteine oder Steroide oder Polypeptide.

Die Fernwirkungen der Hormone sind auch bedeutungsvoll hinsichtlich der Tatsache, daß sie - wie im Falle der Hypophyse - auch die Tätigkeit anderer hormonbildender Organe beeinflussen.

Es werden Hormone aber nicht nur in besonderen Drüsen gebildet, sondern Stoffe mit hormonartiger Wirkung entstehen auch in anderen Geweben; das sind die sogenannten Gewebshormone. Damit ergibt sich die Frage, wie weit der Begriff "Hormon" überhaupt zu fassen ist.

ABDERHALDEN (1) faßt die Hormone als Regulatoren des enzymatischen Geschehens auf, sozusagen als Effektoren für die Fermentwirkung. Das berührt die uns interessierende Frage, ob unsere Effektoren, die

Ovarialhormone, von Bedeutung für den Stoffwechsel der von uns untersuchten Enzyme sind.

2.) Beeinflußbarkeit von Proteasen und Phosphatasen

Über die Eigenschaften und die Einteilung der Proteasen und der unspezifischen Phosphatasen sei hier nur kurz berichtet, ausführliche Mitteilungen siehe HOFFMANN-OSTENHOFF (23) und FLASCHENTRÄGER-LEHNARTZ (17).

Die Proteasen sind die große Gruppe der eiweiß- und peptidspaltenden Fermente. Sie katalysieren die hydrolytische Spaltung von C-N-Bindungen und regeln den ständigen Auf- und Abbau der Eiweißkörper. Entsprechend ihrer Bedeutung ist ihr Vorkommen im Organismus ubiquitär.

Nach einem Vorschlag von GRASSMANN unterschied man zwischen Proteinasen und Peptidasen, BERGMANN wählte später die Ausdrücke Endopeptidasen und Exopeptidasen.

Die Proteinasen werden eingeteilt nach dem pH-Optimum und ihrem spezifischen Verhalten gegenüber Effektoren. Dazu zählen das Pepsin, das Trypsin und das Kathepsin.

Der Kathepsinkomplex kommt intrazellulär in allen tierischen Geweben vor, ist also eine Gewebsprotease und bewirkt nach dem Tode die bakterienfreie Autolyse der Gewebe. In schwachsaurem Milieu ist das Kathepsin am wirksamsten. Es läßt sich aktivieren durch H_2S , HCN; als zelleigene Aktivatoren kommen Gluthation, Cystein, Ascorbinsäure und DPNH in Betracht. Die Wirkung wird gehemmt durch Schwermetalle, Jodessigsäure und Phenylhydrazin.

Eine Kristallisation des Kathepsins ist bis heute nicht gelungen, vermutlich weil kein einheitliches Ferment vorliegt.

Die Phosphatasen gehören zu der großen Gruppe der Esterasen und kommen ebenfalls ubiquitär im Organismus vor. Ihre Substrate sind die Ester der Phosphorsäure, die sie hydrolysieren. Sie werden eingeteilt in Phospho-monoesterasen und Phospho-diesterasen, von denen in dieser Arbeit nur die ersteren bestimmt werden. Je nach ihrem pH-Optimum und ihrem Verhalten gegen Aktivierungskörper werden drei unterschieden:

- 1.) Die alkalische Phosphatase hat ihr pH-Optimum bei pH 9 - 10. Sie wird stark durch Mg- und Mn-Salze aktiviert und durch Alloxan gehemmt. β -Glycerophosphat wird von ihr rascher gespalten als α -Glycerophosphat.
- 2.) Eine zweite, neutrale Phospho-monoesterase mit einem Wirkungsoptimum bei pH 6 - 7 findet sich in der Hefe und in Erythrozyten. Sie wird von Mg- und Mn-Salzen aktiviert und spaltet α -Glycerophosphat rascher als β -Glycerophosphat.
- 3.) Das pH-Optimum der sauren Phosphatase liegt bei pH 6 - 5. Sie wird im Gegensatz zur neutralen Phosphatase von Mg-Salzen nicht aktiviert und spaltet β -Glycerophosphat rascher als α -Glycerophosphat.

Die meisten Phosphatasen werden durch Phosphate, Fluorid, Zystein und Ascorbinsäure gehemmt. Eine Reindarstellung von Phosphoresterasen ist bisher noch nicht gelungen.

3.) Enzyme in den zu untersuchenden Organen

1. Hoden:

Der Hoden ist viel weniger untersucht als das Ovar. Auch er steht in wechselseitiger Beziehung zur Hypophyse und bildet die männlichen Hormone Testosteron, Androsteron und Dehydroandrosteron. Von Fermenten werden Proteasen, Lipasen, Phosphatasen, Arginasen und eine β -Glucosaminase angegeben. Die Proteine stellen den größten Anteil am Hodentrockengewicht dar. (42)

2. Nebenniere:

Die Nebenniere, die, durch die Hypophysenhormone gesteuert, die Corticosteroide ausschüttet, untersuchten ABDERHALDEN und SCHWAB (2) auf Proteinasen. Sie überließen den von Pferden gewonnenen Nebennierenpreßsaft sich selbst und bemerkten mit zunehmender Zeit eine fortschreitende Säuerung mit einer Stickstoffzunahme.

Die Nebenniere weist eine sehr hohe Autolyse auf. BRADLEY und BELFER (12) finden in Versuchen mit Rindernebennieren diese Autolyse maximal bei einem pH-Wert um 4 und glauben daher, die Protease als Kathepsin identifizieren zu können. JUNG und NÜSSELEIN fanden bei ihren Untersuchungen die höchste Kathepsin-Aktivität bei pH = 3,5,

allerdings verwendeten sie Schweineorgane (30). Rund zwei Drittel des Nebennierentrockenrückstandes sind Proteine (42).

3. Hypophyse:

Während über die Hormone der Hypophyse einige Aussagen gemacht werden können, ist über die chemische Zusammensetzung der menschlichen Hypophyse nichts bekannt. Im Vorderlappen beim Rind konnte ein Proteinanteil von 78 %, im Hinterlappen einer von 66 % ermittelt werden (42).

ADAMS (3) konnte bei seinen Untersuchungen zwei proteolytische Enzyme feststellen, von denen das eine bei pH = 3,8, das andere bei pH = 8,3 sein Aktivitätsoptimum hatte. Die Hypophysenversuche von JUNG und NÜSSLEIN (30) entsprechen denen von ADAMS. Sie finden in ihren Versuchen die höchste Aktivität in der Hypophyse bei pH = 3,5.

4.) Hormonwirkung auf den Stoffwechsel

Da die bis jetzt gefundenen Hormone alle sehr unterschiedliche Strukturen haben, besteht kein Anlaß, anzunehmen, sie müßten alle einen ähnlichen Wirkungsmechanismus haben (47). Während Enzyme ganz allgemein als "biologische Katalysatoren" bezeichnet werden können, gibt es einen ähnlich zusammenfassenden Begriff für die Hormonwirkung noch nicht. Es liegt die Schlußfolgerung nahe, daß auch sie irgendwie katalytisch wirken, entweder als Effektoren oder vielleicht als selbständige Katalysatoren.

Die Wirkungen der einzelnen Hormone sind bekannt, aber die Frage nach ihrem Angriffspunkt am Stoffwechsel ist damit noch nicht geklärt. Es steht fest, daß jede Gewebsart ihr spezielles Enzymmuster besitzt, und man könnte annehmen, daß die physiologische Beziehung des Hormons zu seinem Erfolgsorgan in dem Vorhandensein eines Enzymsystems besteht, das durch dieses Hormon spezifisch aktiviert oder gehemmt wird.

DIRSCHERL sieht zwei Möglichkeiten der Hormonwirkung (16). Einmal könnte der Angriff eines Hormons direkt im Gewebe erfolgen, indem es die Permeabilität und die Aktivität der Fermente beeinflusst. Diese Sofortwirkung müßte in vitro bei Zusatz des Hormons zum isolierten Gewebe nachweisbar sein. Andererseits könnte ein indirekter Angriff erfolgen, indem das Hormon die Fermentbildung oder -sekretion

steuert. Diese Dauerwirkung müßte am ganzen Tier geprüft werden.

Nach VILLEE (47) könnte eine "hormonelle Kontrolle von Stoffwechselvorgängen" durch einen der folgenden Mechanismen bewirkt werden:

1. Ein Hormon ändert die Geschwindigkeit, mit der neue Enzymmoleküle aus kleineren Vorstufen aufgebaut werden.
2. Ein Hormon überführt ein bereits existierendes inaktives Protein in ein Protein mit voller enzymatischer Wirksamkeit.
3. Ein Hormon verändert die Permeabilität der Zellmembran oder subzellulärer Strukturen. Damit würden die Substrat- oder Cofaktormoleküle für das Enzym leichter verfügbar.
4. Ein Hormon greift selbst als "Coenzym" oder "Cosubstrat" direkt in das Enzymsystem ein.
5. Ein Hormon konkurriert mit einem der Cofaktoren hinsichtlich eines speziellen Reaktionsortes am Enzymmolekül. Durch Verdrängung eines der notwendigen Cofaktoren würde das Hormon die Gesamtkativität des Enzymsystems herabsetzen.

VILLEE meint, daß, selbst wenn bewiesen wäre, daß ein Hormon an einem bestimmten Reaktionsort wirkt, es durchaus möglich sei, daß dieses Hormon noch eine andere Stoffwechselreaktion beeinflusst. Ein Hormon braucht sich nicht auf einen Reaktionsort zu beschränken, ja, es hat sogar vielleicht mehrere Mechanismen.

Die Hypothesen, die über die gegenseitige Beeinflussung von Hormonen und Fermenten bestehen, haben sich bisher kaum bestätigt.

5.) Steroidhormone und ihre Wirkung in vitro

Die Steroidhormone, zu denen auch die Östrogene und das Progesteron gehören, besitzen das Ringgerüst der Sterine, während die Seitenkette an C₁₇ stark verkürzt ist oder ganz fehlt. Ihrer Löslichkeit nach gehören sie wie die Sterine zu den Lipoiden; die Löslichkeit in Wasser ist sehr gering.

Es ist wenig darüber bekannt, wie Steroidhormone in vitro auf Fermentreaktionen einwirken. DIRSCHERL unterscheidet grundsätzlich zwischen einer Beeinflussung des Fermentes selbst und der etwaigen das Ferment begleitenden Effektoren, ferner zwischen einer Beeinflussung des Substrates und des Ferment-Substrat-Komplexes.

Aus diesem Grunde wird es bei Versuchsergebnissen interessieren, in welchem Reinheitsgrad Ferment und Hormon vorlagen. Organhomogenate sind sehr unreine Enzympräparationen und haben Ähnlichkeit mit dem physiologischen System (15). Es können darin Hormonwirkungen über Effektoren der Enzyme zustande kommen. Entsprechend haben Versuche ergeben, daß bei Verwendung von Enzymen in verschiedenen Reinheitsgraden die Enzymaktivität unterschiedlich ist.

Bei Versuchen, bei denen die Einwirkung verschiedener Steroidhormongruppen auf enzymatische Reaktionen in vitro geprüft wurde, zeigte es sich, daß diese Wirkung spezifisch ist: Eine enzymatische Reaktion wird nicht durch alle Steroidgruppen beeinflusst, zumindest zeigen sich dabei quantitative Unterschiede.

Allgemein gilt für Effektoren - auch für Steroide - , daß Hemmungen viel häufiger als Aktivierungen auftreten. Den Mechanismus der Steroidwirkungen stellt man sich folgendermaßen vor:

Bei der kompetitiven Hemmung konkurriert der Inhibitor mit dem Substrat um die gleiche Haftstelle, da er eine ähnliche Affinität zum Ferment hat, so daß die Wirkung von der Substratkonzentration abhängig ist. Bis jetzt scheint kein Fall bekannt zu sein, in dem ein Steroidhormon auf diese Weise wirkt. Im allgemeinen wird man von den Steroidhormonen keine kompetitiven Hemmungen erwarten dürfen, da sie chemisch nur wenig Ähnlichkeit mit den meisten Substraten zeigen. Die meisten Fälle von Enzymhemmung durch Steroidhormone gehören in die Gruppe der nichtkompetitiven Hemmung. Hier ist die Substratkonzentration unwichtig für die Stärke der Inhibitorwirkung, weil sich der Inhibitor sowohl mit dem Enzym allein als auch mit dem Enzym-Substrat-Komplex verbindet und die Zerfallsgeschwindigkeit des letzteren dadurch herabsetzt. Über unkompetitive Hemmung sind kaum Fälle bekannt geworden. Hierbei wird nur Enzym - Substrat - Inhibitor - Komplex gebildet.

Auch bei der Aktivierung von Enzymen vermutet man verschiedene Mechanismen. Einmal kann durch Hormoneinwirkung die unwirksame Form eines Enzyms in eine wirksame umgewandelt werden. Eine andere Möglichkeit ist, daß ein Aktivator als Protektor wirkt. Aktivierungen können auch erfolgen unter Bildung eines Enzym-Hormon-Komplexes mit Angriff am Substrat.

Immer ist zu beachten, daß die Wirkungsrichtung abhängig ist vom pH und von der Reaktionsgeschwindigkeit und damit von der Konzentration des Effektors, in diesem Falle des Hormons, und von der Enzymkonzentration.

C. DER EINFLUSS VON OVARIALHORMONEN
AUF ENZYME

1.) Kathepsin

PURR hat 1949 Versuche veröffentlicht, in denen er zeigen konnte, daß Kathepsin und Papain in vitro in ihrer Wirksamkeit aktiviert werden, wenn sie vorher mit β -Östradiolbenzoat (Follikelhormon) inkubiert worden sind (41). Er vermutet deshalb einen Zusammenhang zwischen dem weiblichen Keimdrüsenhormon und der intrazellulären Proteolyse. Die Aktivierung soll in der Bildung eines Redoxsystems durch Entstehung von Sulfhydryl ihre Ursache haben. Dieses Redoxsystem braucht die intrazelluläre Proteinase zum Eiweißabbau. Das Hormon soll Wasserstoff abgeben, wie andere SH-Verbindungen, und dadurch das Enzym in die wirksame Form überführen.

DIRSCHERL machte einen entsprechenden Versuch mit kristallisiertem Benzoat (15), wobei sich eine wesentlich schlechtere Aktivierung zeigte. Beim Nachprüfen der Versuche von PURR konnte er weder mit β -Östradiol noch mit Benzoat noch mit Progynon B oleosum das Papain aktivieren. Entsprechend trat auch keine Hydrierung des Ferments auf.

Auch JUNG und KEMMLER (27, 28, 29) konnten diese Versuche nicht bestätigen. Fermentansätzen, bei denen sie das Homogenat von Corpus luteum und verdünntem Liquor folliculi als Enzymlösung verwendeten, wurde Proluton und Progynon zugesetzt. In keinem ihrer Versuche konnten sie einen Effekt feststellen, der durch die Hormonzugabe bedingt war. Eine leichte Inhibierung der Kathepsinwirkung, die etwa 10 % der Gesamtaktivität betrug, mußte als Wirkung des verwendeten alkoholischen Verdünnungsmittels für die Hormonlösungen aufgefaßt werden.

Von FUHRMANN, der sich besonders mit den proteolytischen Enzymen des Endometriums beschäftigt hat, liegen mehrere histochemische und biochemische Arbeiten vor (19, 20). Er beobachtete, daß das Endometrium während des Zyklus sein Enzymprofil verändert. Ein Maximum der Aktivität der von ihm untersuchten Fermente tritt in der dritten Woche zur Zeit der Einidation auf. Er vermutet, daß die Schwankungen der Enzymaktivitäten einer hormonalen Steuerung unterliegen.

Den eiweißspaltenden Fermenten schenkte er besondere Beachtung,

weil jeweils zur Menstruation ein großer Teil des Endometriums fermentativ abgebaut wird. Das Kathepsin tritt aber prämenstruell nicht in erhöhtem Maße auf (20). Jedenfalls konnte FUHRMANN in der Sekretionsphase keine statistisch gesicherte Erhöhung der Kathepsinaktivität gegenüber der Proliferationsphase finden. Er meint deshalb, daß den eiweißspaltenden Fermenten vermutlich zur Hauptsache eine Aufgabe im Stoffwechsel zukommt.

Auch STARK und VORHERR (45), welche die Endopeptidaseaktivität im Endometrium während des Zyklus nach der Methode von ANSON untersuchten, konnten keinen Anstieg der Kathepsinaktivität in der Sekretionsphase beobachten. Sie nehmen an, daß die Schwankungen der Aktivität zufällig sind und keine Beziehung zur jeweiligen Sekretion der Ovarialhormone haben.

Für die Exopeptidasen findet FUHRMANN - im Gegensatz zu den Endopeptidasen - ein signifikantes Aktivitätsmaximum in der dritten Zykluswoche. Für diese Diskrepanz zwischen Exo- und Endopeptidasenaktivität konnte noch keine befriedigende Erklärung gefunden werden.

Auch Exopeptidasen in der Uterusmuskulatur sind von FUHRMANN in ihrer Abhängigkeit von Sexualhormonen untersucht worden. Er konnte nachweisen, daß unter Östrogen- und Progesteroneinfluß im Uterus bei kastrierten Tieren eine Aktivitätssteigerung der Exopeptidasen erfolgt (21).

2.) Saure Phosphatase

MELCHIOR und MICUTA (37) untersuchten die Einwirkung von massiven Östrogendosen auf die unspezifischen Phosphatasen der Rattenhypophyse. Sie konnten nach Östradiolgaben keinen Aktivitätsanstieg der sauren Phosphatase beobachten, ebenso nicht in der Leber, wohl aber im Nierengewebe.

Außer dieser Untersuchung fanden wir in der einschlägigen Literatur keine weiteren Arbeiten, die sich mit der Einwirkung von Sexualhormonen auf die Phosphatasen in Hoden, Nebenniere oder Hypophyse beschäftigen. Wir greifen deshalb auf andere Ergebnisse zurück, die hauptsächlich histochemische sind und an Organen des weiblichen Genitaltrakts gewonnen wurden. Dabei ist zu bemerken, daß über alkalische Phosphatase weit mehr gearbeitet worden ist und bisher nur wenige

Befunde über saure Phosphatase in den Genitalorganen vorliegen. Sehr interessant scheinen uns die Phosphatasen des Endometriums während des mensuellen Zyklus zu sein, d. h. in ihrer physiologischen Beeinflussung durch Sexualhormone. Nach den Untersuchungen von FUHRMANN (19) zeigt die saure Phosphatase quantitativ und histochemisch ein anderes Verhalten als die alkalische Phosphatase (siehe S. 13). Das Maximum der Aktivität konnte in den letzten Zyklastagen vor der Menstruation beobachtet werden. Da gesteigerte Aktivität der sauren Phosphatase auch in der Dezidua und während der Gravidität beobachtet wurde, besteht für FUHRMANN Grund zu der Annahme, daß die saure Phosphatase mehr dem Einfluß des Progesterons unterliegt.

BURGER (13) hat sich mit der alkalischen und sauren Serumphosphatase während des Menstruationszyklus beschäftigt. Er verfolgte das Verhalten der Phosphatasen bei neun gesunden Frauen unter Kontrolle der ovariellen Funktion und fand, daß sie keine vom menstruellen Zyklus abhängigen Aktivitätsveränderungen aufweisen. Auch bei in vitro-Versuchen mit den weiblichen Sexualhormonen ergaben sich keine charakteristischen Befunde.

3.) Alkalische Phosphatase

MELCHIOR und MICUTA (37) untersuchten unter anderem die Aktivität der alkalischen Phosphatase in der Rattenhypophyse nach Behandlung mit Diäthylstilböstrol in vivo. Sie beobachteten einen bestimmten Anstieg der Phosphatase in der Hypophyse, einen Abfall in der Niere, sowie einen Anstieg in der Leber.

Seit der histochemischen Darstellung der alkalischen Phosphatase durch GOMORI (22) und TAKAMATSU (46) sind sehr viele Arbeiten über alkalische Phosphatase im Endometrium erschienen.

Die ersten Untersuchungen hierüber sind 1940 von ATKINSON und ENGLE (10) veröffentlicht worden. Sie fanden kennzeichnende Veränderungen im Enzymgehalt der Drüsen und des oberflächlichen Epithels des Endometriums im hormonbehandelten ovariectomierten Affen und in menschlichen Endometrien verschiedener Entwicklungsstufen. Die Aktivität der alkalischen Phosphatase, die in der Proliferationsphase hoch ist, nimmt in der Sekretionsphase ab und verschwindet einige Tage vor Beginn der Menstruation.

Auch aus den Beobachtungen von OBER (39) geht hervor, daß die Phosphataseaktivität hormonal gesteuert wird. In einer Studie über die Veränderungen der alkalischen Phosphatase während des mensuellen Zyklus konnte er nachweisen, daß im Ovar alkalische Phosphatase vor allem in den Drüsenzellen, die Steroidhormone bilden, d. h. in Theka interna und Granulosa-Luteinzellen, vorkommt.

In der gleichen Arbeit konnte er beweisen, daß die alkalische Phosphatase des Endometriums von den Ovarialhormonen abhängig ist: Unter Östrogeneinwirkung nimmt die Aktivität zu, während Progesteron einen hemmenden Einfluß ausübt. Damit bestätigt er die Ergebnisse von ATKINSON und ENGLE.

Nach FUHRMANN (19) findet sich in den Drüsenlumen des Endometriums die stärkste Phosphatasereaktion in der dritten Zykluswoche. Die quantitativen Untersuchungen von JONES und Mitarbeitern (26) und MCKAY und Mitarbeitern (36) stehen mit seinen histochemischen Befunden im Einklang. - Zwischen dem vierzehnten und achtzehnten Tag des Zyklus steigt die Aktivität um ca. 200 % an. Übereinstimmend mit dem Tierexperiment (7, 8, 9) nimmt FUHRMANN daher an, daß Follikelhormon eine Steigerung der Phosphataseaktivität verursacht und kleine Mengen Progesteron synergistisch wirken (39, 40), wie zur Zeit des Follikelsprungs, daß aber zunehmender Progesteroneinfluß eine entgegengesetzte Wirkung zeigt und die Aktivität der alkalischen Phosphatase hemmt (7, 39, 40).

Es liegen auch histochemische Arbeiten vor, nach denen die alkalische Phosphatase nicht nur des Endo- und Myometriums, sondern auch der Vagina, des Cervixepithels, des Ovidukts und der Symphyse durch das Follikelhormon typisch im Sinne einer Aktivierung beeinflusst wird (ATKINSON, AUGUSTIN, HARRIS, KAMELL, MARVIS, OBER, TALMAGE - nach BURGER (13)). Zusammenfassend kann man also sagen, daß Follikelhormon die alkalische Phosphatase aktiviert, daß aber Progesteron den Anstieg der alkalischen Phosphatase im Bereich des Genitales hemmt.

Einige Arbeiten beschäftigen sich mit den Veränderungen der alkalischen Phosphatase des Blutes während des Menstruationszyklus. Während YAMANAKA (48) im Blut Variationen der Fermentwirkung bei der Frau mit einem Anstieg in der Follikelphase und einem Abfall in der

Gelbkörperphase feststellt, konnte BURGER (13) im Vergleich dazu keine sichere Beeinflussung der alkalischen Serumphosphatase während des Menstruationszyklus finden. BURGER meint, man könne aber nicht darauf schließen, daß bei den Organphosphatasen dieselben Verhältnisse vorliegen müßten.

ALDMAN und Mitarbeiter (4) erzielten nämlich bei ihren in vitro-Versuchen durch Östradiolphosphat eine Hemmung der alkalischen Phosphatase der Niere. Dabei wirkte das Östradioldiphosphat weitaus am stärksten hemmend. Unerwarteterweise erwies sich die Hemmung nicht als substratkompetitiv. Es wird die Bildung eines Ferment-Substrat-Hormon-Komplexes angenommen.

D. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

I. METHODIK

1.) Herstellung der Substratlösungen

Die Fermentaktivitätsbestimmungen führten wir mit ungereinigten Enzymlösungen durch. Für die Gewebezubereitung folgten wir den Angaben von LANG und SIEBERT (32). Dabei haben wir frischgeschlachteten Schweinen die Nebennieren und die Hypophysen und Stieren, ebenfalls sofort nach dem Schlachten, den Hoden entnommen, diese Organe in eisgekühlten Gefäßen transportiert und so schnell wie möglich verarbeitet. War das Gewebe blutig, wurde es vorher mit physiologischer Kochsalzlösung gespült. Anschließend wurden die Organe von Bindegewebe befreit, abgewogen und mit der Schere möglichst fein zerkleinert, alles unter ständiger Kühlung. Unter Zugabe von 2 Volumenteilen 30 % iger eisgekühlter Rohrzuckerlösung wurde das Gewebe homogenisiert und anschließend mittels eines Porzellanpistills durch ein doppelt aufgespanntes, engmaschiges Leinentuch gepreßt.

Der so gewonnene Gewebssaft enthält die gesamten Zellbestandteile, die allerdings aus dem Zellverband herausgelöst sind.

2.) Hormonzusätze

Um die Wirksamkeit von Hormonen zu prüfen, haben wir Follikelhormon und Corpus-luteum-Hormon in Form von " P r o g y n o n " und " P r o l u t o n " der Firma Schering, Berlin, gewählt. Beide Hormone wurden in verschiedenen Konzentrationen verwendet. Wir sind so vorgegangen, daß wir die Hormonmengen den Fermentansätzen zusetzten und 60 Minuten miteinander vorinkubierten, um eine Reaktion zu erreichen.

3.) Nachweis der proteolytischen Fermentaktivität

Der Nachweis eines fermentativen Abbaus beruht auf Darstellung der Spaltprodukte, in diesem Fall von Aminosäuren. Die Messung der

proteolytischen Aktivität erfolgte nach der kolorimetrischen Methode von ANSON (6), der heute gebräuchlichsten Standardmethode. Als Substrat wird eine Lösung von denaturiertem Rinderhämoglobin verwendet, die, mit bestimmten Pufferlösungen für ein optimales pH versetzt, mit der zu untersuchenden Fermentlösung bei einer Temperatur von 37° Celsius inkubiert wird. Nach bestimmten Inkubationszeiten werden die Fermentansätze durch Zugabe eines Eiweißfällungsmittels, z. B. Trichloressigsäure (TCE), unterbrochen.

Im klaren Filtrat können nun, unter Zugabe von Sodalösung, mit dem Phenolreagenz nach FOLIN und CIOCALTEAU (18) die freigesetzten Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan auf Grund ihrer phenolischen Struktur zu einer blauen Farbreaktion gebracht und im Photometer gemessen werden.

Bei dieser Methode wird die Wirkung des Kathepsinkomplexes erfasst, wobei allerdings nicht zu entscheiden ist, welche der Endo- und Exopeptidasen die Hauptwirkung ausübt.

Mit Hilfe einer Eichkurve lassen sich die abgebauten Aminosäuremengen genau feststellen.

Bei unseren Versuchen wurden folgende Lösungen verwendet:

1. Substrat: 2,5 % Rinderhämoglobin; 2,5 % Kasein zum Einarbeiten.
2. Fermentlösung: Gewebshomogenate von Hoden, Nebenniere und Hypophyse, verdünnt mit 0,9 % NaCl; Lösungen von kristallinem Pankreatin, Pepsin und Trypsin zum Einarbeiten.
3. Hormone: Verdünnt mit 0,9 % NaCl

a) Östradiol als "Progynon" der Firma Schering, Berlin, in den Konzentrationen von 1, 10, 100 γ je Ansatz.

b) Progesteron als "Proluton" der Firma Schering, Berlin, in den Konzentrationen von 1, 10, 100, 1000 γ je Ansatz.

4. Puffer: pH 3,5; 0,5 m Na-Acetat-Essigsäure.

Das pH von 3,5 wurde als Optimum für die Aktivität der Proteasen von JUNG und NÜSSLEIN gefunden (30).

Zum Einarbeiten, entsprechend den verwendeten Fermenten:

pH 7,2 und 8,0; 0,2 m prim. und sek. Phosphat (nach SØRENSEN),
pH 1,6 und 2,0; 0,2 m Glykokoll-HCl.

5. 10 % TCE-Lösung zur Unterbrechung der Enzymreaktion.

Die Inkubation unserer Reaktionsgemische erfolgte im Wasserbad bei 37° C. Als Inkubationszeiten wurden 0, 20 und 45 Min. gewählt.

Die Ferment-Hormon-Gemische wurden zunächst 60 Minuten im Wasserbad vorinkubiert, die Substrat-Puffer-Gemische getrennt davon 10 Minuten, um sie ebenfalls auf die Temperatur von 37° C zu bringen. Den 0-Werten wurde schon vor Zugabe der Ferment-Hormon-Lösung TCE zugegeben. Zur Kontrolle für die in Frage stehende hormonale Beeinflussung der proteolytischen Aktivität wurden stets zwei Versuchsgänge ohne jegliche Hormonzugabe gemacht, der eine mit, der andere ohne einstündige Inkubation.

Die Versuchsanordnung setzte sich also folgendermaßen zusammen:

1. 1 ml Substrat
2. 2 ml Puffer
3. 1 ml Ferment-Hormon-Gemisch

Inkubation

4. 2 ml TCE-Lösung

Die unterbrochenen Fermentansätze wurden filtriert und 2 ml des klaren Ansatzes zur Tyrosinbestimmung in 25-ml-Kölbchen pipettiert, die 5 ml 14 %ige Sodalösung enthielten. Dazu kam 1 ml Folinreagenz, das 1:3 mit H₂O verdünnt war, dann wurde mit Aqua dest. auf 25 ml aufgefüllt.

Die kolorimetrische Bestimmung der Kathepsinaktivität erfolgte im Photometer Elko II mit Filter S 72 E 54 gegen den Leerwert aus Sodalösung und Folinreagenz. Für die Messungen benützten wir 1 cm-Küvetten. Die freigesetzte Tyrosinmenge konnte anhand einer mit l-Tyrosin angelegten Eichkurve errechnet werden. Der Extinktionswert nach 0 Minuten wurde von den übrigen Werten subtrahiert.

Eichkurve: Zur Anfertigung der Eichkurve wurde 1 g Tyrosin in 1 l Wasser gelöst und durch Verdünnung Lösungen hergestellt, die 5 bzw. 10 γ Tyrosin in 1 ml enthielten. Für die Eichkurve wurden die Extinktionswerte von 5, 10, 20, 30, 40, 50 und 100 γ Tyrosin gemessen und in einem Ordinatensystem aufgetragen.

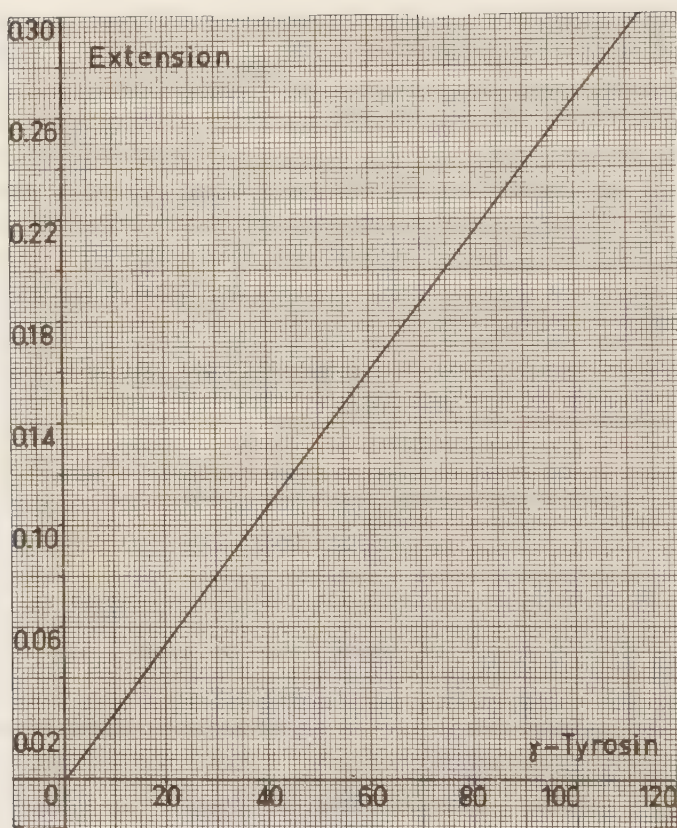


Abb. 1: Eichkurve für Tyrosin

4.) Bestimmung der sauren Phosphatase

Die Messung der sauren Phosphataseaktivität erfolgte nach der Methode von HUDSON und LONDON (24). Hierbei wird $\text{Na}_2\text{-}\beta$ -Glycerophosphat als Substrat benützt und aus dem freigesetzten Phosphat Phosphor photometrisch gemessen. Die Bestimmung des Phosphors wurde nach LOHMANN und JENDRASSIK durchgeführt (34).

Im einzelnen wurde folgende Versuchsanordnung angewandt:

1. Substrat: 410 mg $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ und 500 mg $\text{Na}_2\text{-}\beta$ -Glycerophosphat wurden in etwas Wasser aufgelöst, dazu 80 ml 0,2 m Acetatpuffer

pH = 5,0 gegeben und das Ganze mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt.

2. Fermentlösung: Wir verwendeten die schon erwähnten Gewebshomogenate und zum Einarbeiten ein Homogenat aus Placenta.

3. Hormone: Sie wurden wieder in den oben angegebenen Konzentrationen benützt.

4. 30 % ige TCE-Lösung zur Unterbrechung der Fermentreaktion.

Die Bebrütung erfolgte im Wasserbad bei 37° C. Jeden Versuch inkubierten wir wieder bei drei Zeiten (0, 20, 45 Minuten). Auch hier wurden Versuchsansätze ohne Hormonzugabe gemacht.

Die Versuchsanordnung war also folgende:

1. 4 ml Substratpuffer
 2. 1 ml Ferment-Hormon-Gemisch
-
- Inkubation
3. 1 ml 30 % TCE-Lösung

5.) Bestimmung der alkalischen Phosphatase

Zum Nachweis der alkalischen Phosphatase haben wir die Methode von JENNER und KAY benützt (25):

1. Substrat-Puffer-Lösung: Diese wird aus 0,2 m Glykokoll-NaOH-Puffer pH = 9,0 und einer 2,5 % igen Na₂-β-Glycerophosphat-Stammlösung hergestellt. Die Substrat-Puffer-Lösung muß vor jedem Ansatz frisch hergestellt werden. Dazu werden 1 Teil Stammlösung und 5 Teile Puffer miteinander vermischt.

2. Fermentlösung: Gewebshomogenate.

3. Hormone: In den oben angegebenen Konzentrationen.

4. 15 % ige TCE-Lösung zur Unterbrechung der Fermentreaktion.

Wiederum wurde die Bebrütung im Wasserbad bei 37° C durchgeführt. Die Inkubationszeiten lagen bei 0, 20, 45 Minuten. Auch bei der Bestimmung der alkalischen Phosphatase machten wir Kontrollversuche ohne Hormonzusatz.

Die Versuchsanordnung setzt sich wie folgt zusammen:

1. 5 ml Substrat-Puffer-Lösung
 2. 1 ml Ferment-Hormon-Gemisch
-
- Inkubation
3. 2 ml 15 % TCE-Lösung

Phosphatbestimmung:

Sowohl bei der sauren als auch bei der alkalischen Phosphataseuntersuchung wurde die Bestimmung der freigesetzten Phosphatmengen nach LOHMANN und JENDRASSIK durchgeführt (34).

Als Reagenzien benötigte man eine 2,5 % ige Ammoniummolybdat-Lösung in 5 n H_2SO_4 und eine nach Vorschrift bereitete Amidollösung.

Die mit TCE ausgefällten Ansätze wurden filtriert, 2 ml des klaren Filtrats wurden mit 5 ml Ammoniummolybdat-Lösung und 1 ml Amidollösung in 25-ml-Meßkölbchen pipettiert, anschließend wurde mit Aqua dest. bis 25 ml aufgefüllt. Die Kölbchen mußten nun noch 7 Minuten bei $37^{\circ}C$ und dann 7 Minuten bei $20^{\circ}C$ im Wasserbad stehen. Die in saurem Milieu durch Reaktion von Phosphat mit Ammon-Molybdat auftretende blaue Farbe konnte im Photometer bei Filter J 61,7 - 55 gemessen werden. Die freigesetzten Phosphormengen wurden aus einer Eichkurve abgelesen.

Eichkurve: Zur Herstellung einer Eichkurve wurden 0,4390 g trockenes KH_2PO_4 in 1 l Wasser aufgelöst. Diese 10 mg % ige Phosphorlösung

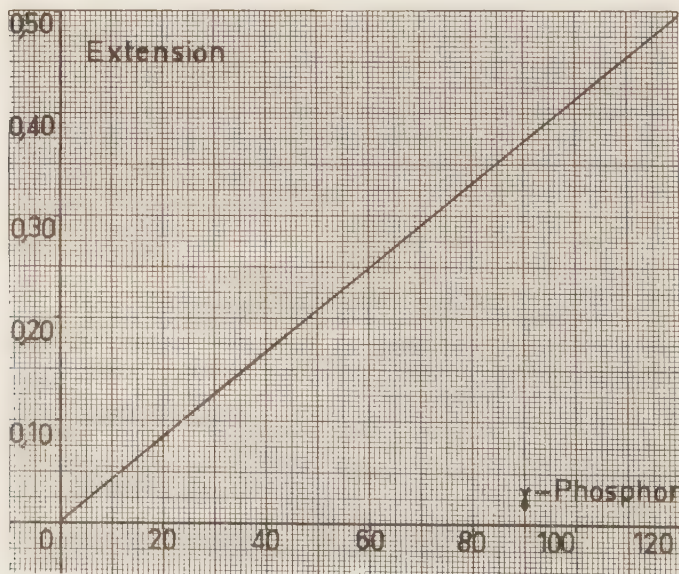


Abb.2: Eichkurve für Phosphatasebestimmung

wurde weiter verdünnt, bis in 1 ml 10 - 100 μ g Phosphor enthalten waren. Durch Messung von verschiedenen Phosphorkonzentrationen zwischen 10 und 100 μ g konnte die Eichkurve auf Abb.2 festgesetzt werden.

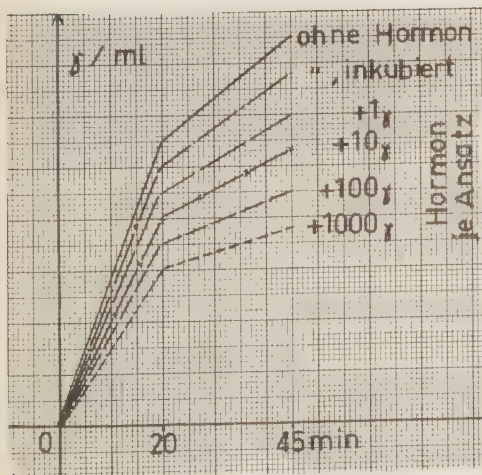
6.) Stickstoffbestimmung und Berechnung

Um die Aktivität der einzelnen Versuche vergleichen zu können, haben wir den Stickstoffgehalt der Homogenate bestimmt und als Bezugsgröße gewählt.

Die Stickstoffbestimmung wurde nach dem Mikro-KJELDAHL-Verfahren, das nach BEET modifiziert ist (11), durchgeführt und der ermittelte Stickstoffwert in 1 ml der betreffenden Fermentlösung errechnet.

Alle Ergebnisse wurden auf mg N und Stundenwert aus der gemessenen 20-Minuten-Aktivität errechnet, um als Einheiten γ Tyrosin/mg N/h und γ Phosphat/mg N/h zu erhalten. Die Durchschnittswerte der Untersuchungsreihen ohne Hormon und ohne einstündige Inkubation wurden bei der Prozentberechnung gleich 100 % gesetzt. - Die Streubreite von Versuchsreihen wurde nach folgender Formel berechnet:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x^i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$



Bemerkung:

Um unsere Versuchsergebnisse unter "II. Untersuchungsergebnisse" anhand von Zeichnungen zu verdeutlichen, wählten wir nebenstehende Darstellungsweise.

Abb.3: Darstellungsweise

II. UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE

1.) Kathepsin

Vorbemerkungen:

JUNG und NUSSLEIN (30) konnten in endokrinen Organen proteolytische Enzyme mit einem Wirkungsoptimum im Kathepsinbereich bei pH = 3,5 feststellen. Ebenso testeten sie die optimalen Verdünnungen der für die Enzymuntersuchungen verwendeten Homogenate zur Erreichung eines linearen Reaktionsablaufes der proteolytischen Aktivität aus. Deshalb übernahmen wir aus ihren Untersuchungen das pH und die Verdünnungen:

	Hoden	Nebenniere	Hypophyse
33,3 % ige Homogenate	1 ml ad 10 ml	1 ml ad 50 ml	1 ml ad 25 ml

a) Vorarbeiten

Um mit den Reaktionen zum Nachweis proteolytischer Fermente vertraut zu werden und um uns einzuarbeiten, führten wir zunächst Unter-

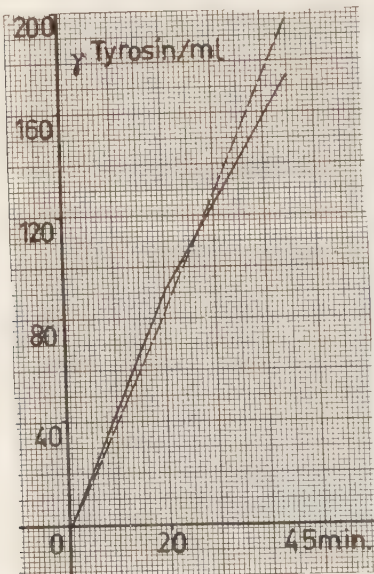


Abb. 4:

Abbau einer 2,5 % igen Kaseinlösung durch Trypsin (0,05 %).
Ausgezogen: pH = 7,2
Gestrichelt: pH = 8,0

suchungen mit kristallinen Fermenten durch, und zwar mit Trypsin, Pankreatin und Pepsin. Ihre Einwirkungsmöglichkeit auf 2,5 % ige Kaseinlösung wurde in verschiedenen Konzentrationen ausgetestet. Außerdem wurde die Wirkung des pH beobachtet (siehe Abb. 4 bis 6).

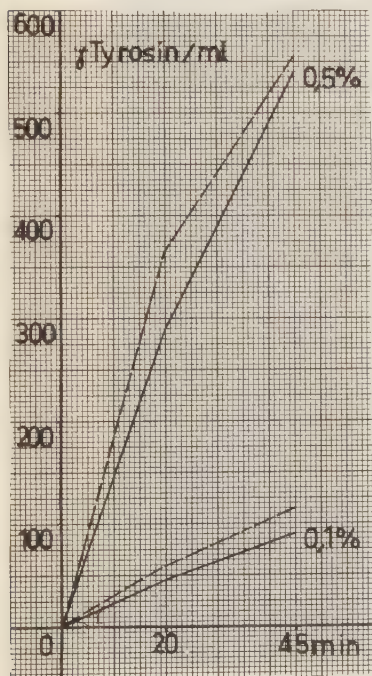


Abb. 5:

Abbau einer 2,5 % igen Kaseinlösung durch Pankreatin (0,5 %, 0,1 %).

Ausgezogen: pH = 7,2

Gestrichelt: pH = 8,0

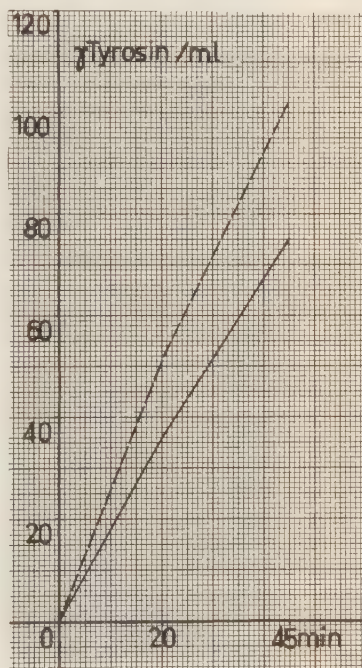


Abb. 6:

Abbau einer 2,5 % igen Kaseinlösung durch Pepsin (0,05 %).

Ausgezogen: pH = 1,6

Gestrichelt: pH = 2,0

b) Ergebnisse

Kathepsinaktivität im Bullenhoden

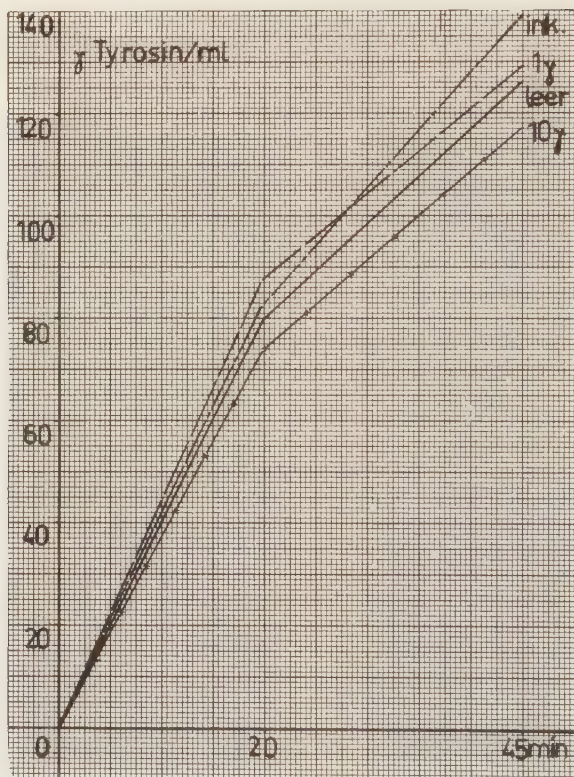


Abb. 7: Verlauf von Reaktionskurven unter Zusatz von Progynon.

Tab. 1: Durchschnittswerte der spezifischen Aktivität der Homogenate.

Homogenat	γ T/mg N/h	%
ohne Progynon	634 ± 47	100
ohne Prog., ink.	645 ± 12	102
ink. + 10 γ Prog.	586 ± 31	92
ink. + 100 γ Prog.	keine Aktivität	

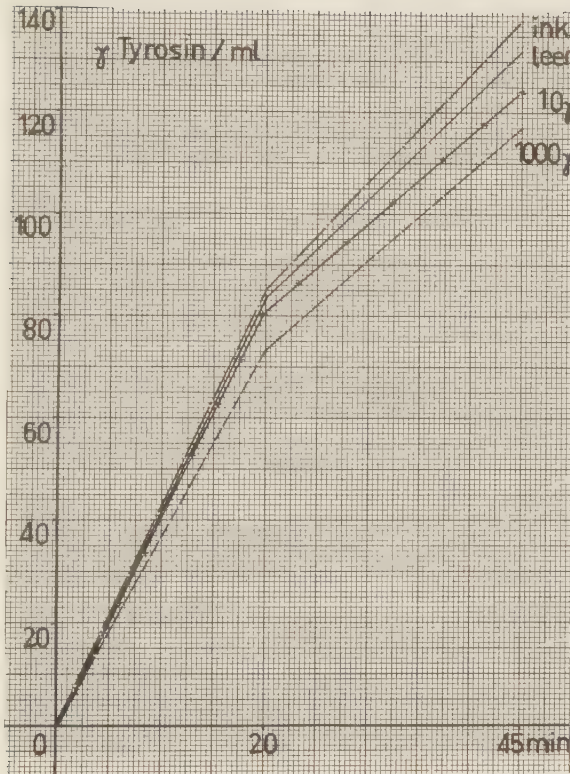


Abb.8: Verlauf von Reaktionskurven unter Zusatz von Proluton.

Tab.2: Durchschnittswerte der spezifischen Aktivität der Homogenate.

Homogenat	γ T/mg N/h	%
ohne Proluton	634 ± 47	100
ohne Prol., ink.	645 ± 12	102
ink. + 10 γ Prol.	615 ± 8	97
ink. + 100 γ Prol.	561 ± 54	88
ink. + 1000 γ Prol.	543 ± 22	86

Kathepsinaktivität in Schweinenebenniere

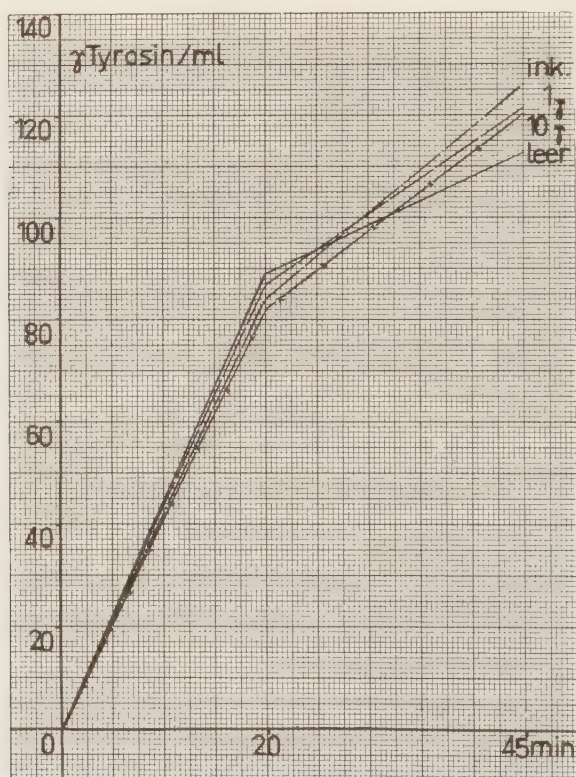


Abb.9: Verlauf von Reaktionskurven unter Zusatz von Progynon.

Tab.3: Durchschnittswerte der spezifischen Aktivität der Homogenate.

Homogenat	γ T/mg N/h	%
ohne Progynon	2636 ± 626	100
ohne Prog., ink.	2212 ± 415	85
ink. + 1γ Prog.	2339 ± 642	89
ink. + 10γ Prog.	2617 ± 974	99
ink. + 100γ Prog.	14 ± 25	0,5

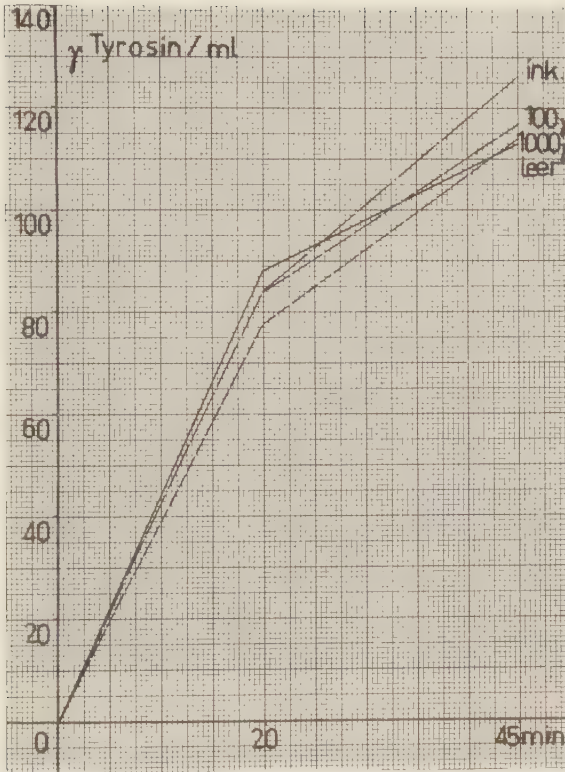


Abb.10: Verlauf von Reaktionskurven unter Zusatz von Proluton.

Tab.4: Durchschnittswerte der spezifischen Aktivität der Homogenate.

Homogenat	γ T/mg N/h	%
ohne Proluton	2636 ± 626	100
ohne Prol., ink.	2212 ± 415	85
ink. + 1 γ Prol.	2298 ± 396	87
ink. + 10 γ Prol.	2625 ± 782	99
ink. + 100 γ Prol.	2555 ± 865	97
ink. + 1000 γ Prol.	2109 ± 559	80

Kathepsinaktivität in Schweinehypophyse

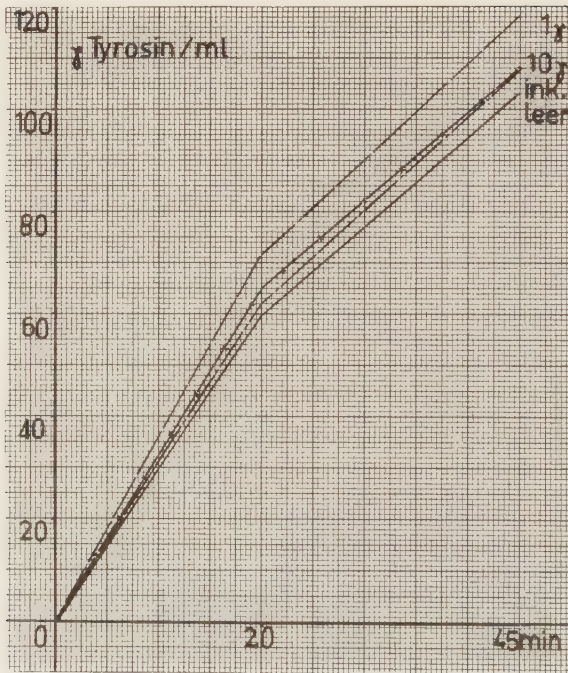


Abb.11: Verlauf von Reaktionskurven unter Zusatz von Progynon.

Tab.5: Durchschnittswerte der spezifischen Aktivität der Homogenate.

Homogenat	γ T/mg N/h	%
ohne Progynon	646 ± 111	100
ohne Prog., ink.	690 ± 160	107
ink. + 1 γ Prog.	775 ± 67	120
ink. + 10 γ Prog.	732 ± 96	113
ink. + 100 γ Prog.	keine Aktivität	

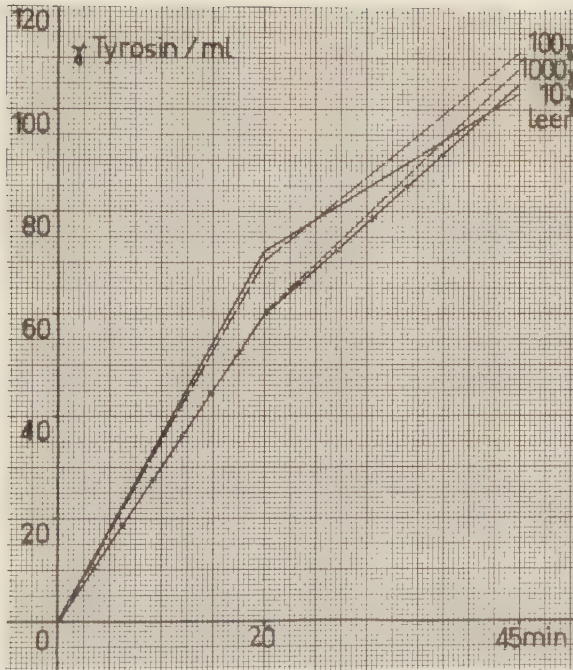


Abb.12: Verlauf von Reaktionskurven unter Zusatz von Proluton.

Tab.6: Durchschnittswerte der spezifischen Aktivität der Homogenate.

Homogenat	γ T/mg N/h	%
ohne Proluton	646 ± 111	100
ohne Prol., ink.	690 ± 160	107
ink. + 1 γ Prol.	651 ± 220	101
ink. + 10 γ Prol.	671 ± 88	104
ink. + 100 γ Prol.	644 ± 190	100
ink. + 1000 γ Prol.	587 ± 123	91

c) Auswertung

Hormon	PROGYNON						PROLUTON					
	Hoden	Nebenniere	Hypophyse	Hoden	Nebenniere	Hypophyse	Hoden	Nebenniere	Hypophyse	Hoden	Nebenniere	Hypophyse
ohne	634	100	2636	100	646	100	634	100	2636	100	646	100
ohne, ink.	645	102	2212	85	690	107	645	102	2212	85	690	107
ink. + 1 γ	-	-	2339	89	775	120	-	-	2298	87	651	101
ink. + 10 γ	586	92	2617	99	732	113	615	97	2625	99	671	104
ink. + 100 γ	0	0	14	95	0	0	561	88	2555	97	644	100
ink. + 1000 γ							543	86	2109	80	587	91
	γ T	%	γ T	%	γ T	%	γ T	%	γ T	%	γ T	%

Tab. 7: Vergleich der Kariesinaktivität unter Zusatz von Progynon und Proluton.

Zu Tabelle 7:

Tabelle 7 gibt die spezifischen Aktivitäten des Kathepsins in Hoden, Nebenniere und Hypophyse wieder nebst der prozentualen Berechnung der Aktivitätsänderungen nach Einwirkung von "Progynon" und "Proluton". Die gefundenen Werte in γ -Tyrosin/mg N/h liegen in der Größenordnung der von NÜSSLEIN bei pH = 3,5 gemessenen Werte (38). Die Aktivität der Nebenniere ist mehr als viermal höher als die in Hoden und Hypophyse, die etwa gleich sind.

Die großen Schwankungen der Einzelbestimmungen aus den Paralleluntersuchungen und damit die großen Differenzen bei der Berechnung der Durchschnittswerte sind vermutlich darauf zurückzuführen, daß bei den Paralleluntersuchungen jeweils verschieden funktionstüchtige Organe zur Verfügung standen. Am meisten streuen die einzelnen Werte bei Nebenniere, aber auch bei Hypophyse. Dagegen liegen ziemlich einheitliche Werte bei den Versuchen mit Hodenhomogenat vor. Wir führen das darauf zurück, daß zum Homogenisieren jeweils nur ein Organ eines jungen fertilen Tieres verwendet wurde, so daß in den verschiedenen Hoden jeweils ein annähernd gleicher Funktionszustand vorlag.

Die Untersuchungen mit "Progynon" zeigen je nach dem untersuchten Organ verschiedene Ergebnisse. Das Kathepsin der Nebenniere erweist sich als indifferent durch Östrogenbeeinflussung, scheint aber durch Inkubation gehemmt zu werden. Durch Hormonzusatz steigt die Aktivität wieder an. Im Hoden wird das Kathepsin durch Östrogen leicht gehemmt, während das Kathepsin der Hypophyse auffallend aktiviert wird.

Überraschend ist, daß bei der Zugabe von 100 γ "Progynon" pro Versuchsansatz bei allen drei Organen eine absolute Hemmung der Kathepsinaktivität zu beobachten war. Da wir annahmen, daß dieser Effekt weniger auf die Wirkung des konzentrierten Hormons als vielmehr auf die des alkoholischen Verdünnungsmittels zurückzuführen ist, testeten wir das Lösungsmittel zur Klärung dieser Frage. Wir ließen es entsprechend der Konzentration von 100 γ "Progynon" mitlaufen. Beim Arbeiten mit reinem Lösungsmittel zeigte sich ebenfalls eine absolute Hemmung. Damit scheint uns bewiesen, daß diese Änderung der Aktivitäten eine Wirkung des Verdünnungsmittels ist.

Bei den mit "Proluton" durchgeführten Versuchen ergibt sich mit

steigenden Hormonkonzentrationen zunehmende Hemmung der Kathepsinaktivität in Hoden und Nebenniere. Letzteres Organ scheint besonders anzusprechen. Die Hypophyse zeigt eine ganz geringe Aktivierung.

Abgesehen davon, ergaben die Lösungsmittelversuche, die wir mit der Flüssigkeitsmenge durchführten, die 1000 γ "Proluton" entspricht, eine Inhibierung, die allerdings stärker ist als bei den mit Corpus-luteum-Hormon gemachten Versuchen. Wir meinen, daß auch diese Veränderungen auf die Wirkung des Lösungsmittels zurückzuführen sind.

2.) Saure Phosphatase

a) Vorarbeiten

Um die Methode der Phosphatasebestimmung zu erlernen, die günstigsten Verdünnungen für die jeweilige Aktivität der sauren Phosphatase in den verschiedenen Organen zu ermitteln und die Hormonwirkung zu beobachten, machten wir zunächst folgende Versuche:

1. Untersuchungen mit Placentagewebe:

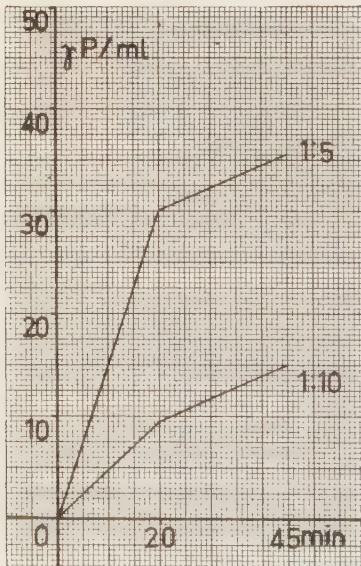


Abb.13: Saure Phosphataseaktivität in der menschlichen Placenta.

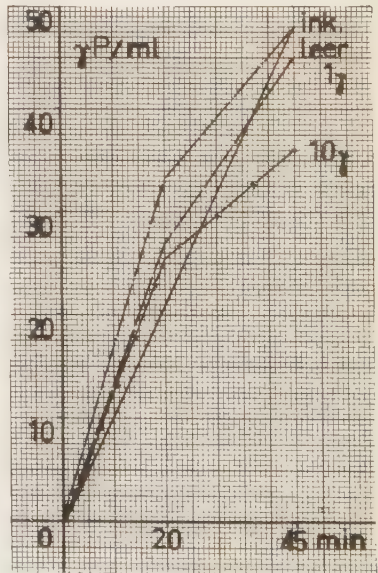


Abb.14: Aktivität der sauren Phosphatase in der menschlichen Placenta (1:5) unter Einwirkung von "Progynon".

Mit 10 %iger Rohrzuckerlösung wurde die Placenta vor der Zerkleinerung entblutet. 150 g Placenta und 300 ccm 30 %iger Rohrzuckerlösung ergaben 291 ccm Homogenat. Das Gewebe ließ sich schlecht homogenisieren, beim Durchpressen durch das aufgespannte Tuch blieb etwa ein Viertel des Gesamtgewebes als Bindegewebe zurück.

2. Suche nach den optimalen Homogenatverdünnungen:

Da uns die Aktivität der sauren Phosphatase in den Organen Hoden, Nebenniere und Hypophyse unbekannt war, ermittelten wir erst die optimalen Verdünnungen des Homogenats. Wir versuchten, zunächst mit den optimalen Konzentrationen für die Aktivität der Proteasen zu arbeiten.

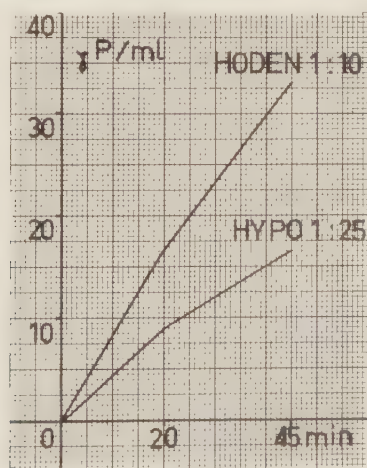


Abb.15: Aktivität der sauren Phosphatase in Hoden und Hypophyse. Die Nebenniere zeigte bei der Verdünnung von 1:50 keine Aktivität.

Dabei zeigte sich, daß diese Konzentrationen z.T. zu niedrig lagen. Deshalb wählten wir für unsere Arbeit folgende Verdünnungen der 33,3 %igen Homogenate:

Hoden	1 : 10
Nebenniere	1 : 5
Hypophyse	1 : 10

b) Ergebnisse

Saure Phosphataseaktivität im Bullenhoden

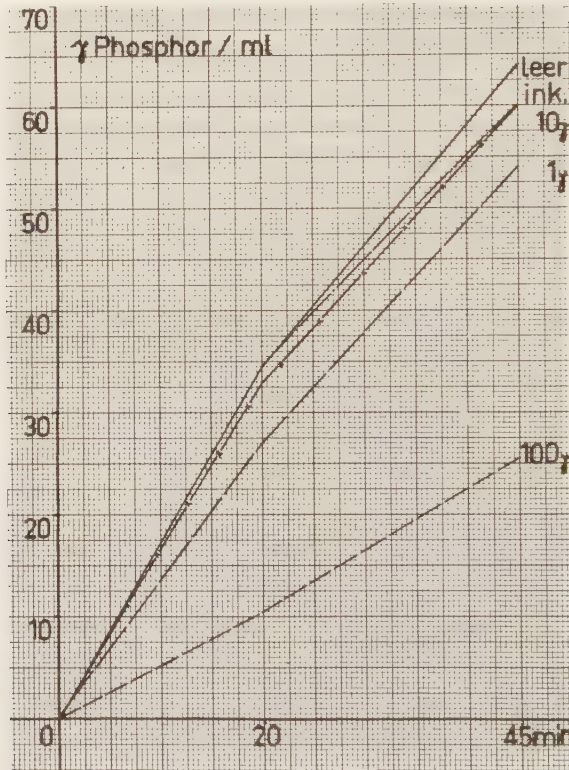


Abb.16: Verlauf von Reaktionskurven unter Zusatz von Progynon.

Tab.8: Durchschnittswerte der spezifischen Aktivität der Homogenate.

Homogenat	γ P/mg N/h	%
ohne Progynon	204 ± 54	100
ohne Prog., ink.	208 ± 17	102
ink. + 1γ Prog.	195 ± 5	96
ink. + 10γ Prog.	183 ± 63	90
ink. + 100γ Prog.	72 ± 36	35

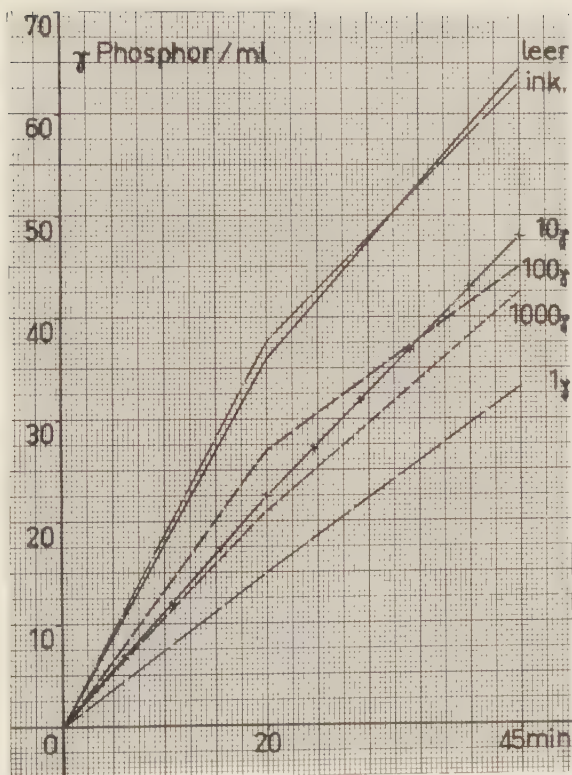


Abb.17: Verlauf von Reaktionskurven unter Zusatz von Proluton.

Tab.9: Durchschnittswerte der spezifischen Aktivität der Homogenate.

Homogenat	γ P/mg N/h	%
ohne Proluton	204 $\pm$ 54	100
ohne Prol., ink.	208 $\pm$ 17	102
ink. + 1γ Prol.	181 $\pm$ 48	89
ink. + 10γ Prol.	165 $\pm$ 48	81
ink. + 100γ Prol.	165 $\pm$ 58	81
ink. + 1000γ Prol.	157 $\pm$ 57	77

Saure Phosphataseaktivität in Schweine-Nebenniere

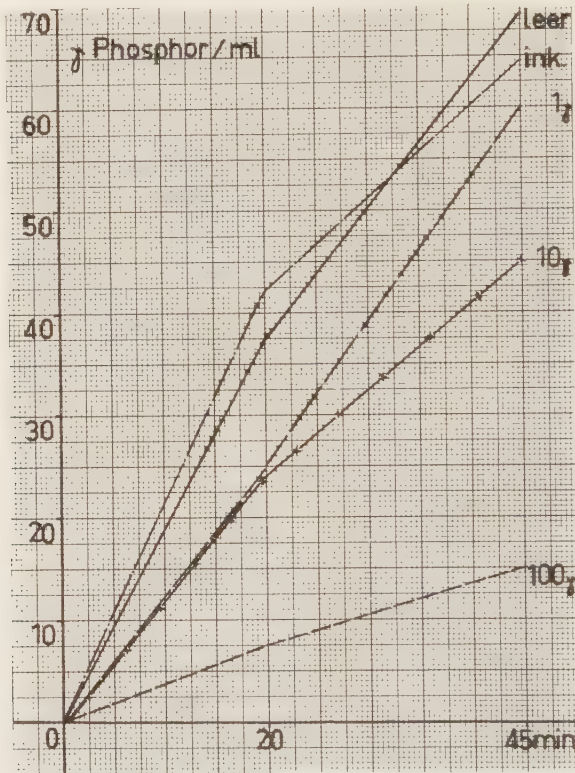


Abb.18: Verlauf von Reaktionskurven unter Zusatz von Progynon.

Tab.10: Durchschnittswerte der spezifischen Aktivität der Homogenate.

Homogenat	$\gamma \text{ P/mg N/h}$	%
ohne Progynon	110 ± 19	100
ohne Prog., ink.	88 ± 29	80
ink. + 1γ Prog.	61 ± 4	55
ink. + 10γ Prog.	93 ± 21	85
ink. + 100γ Prog.	45 ± 35	41

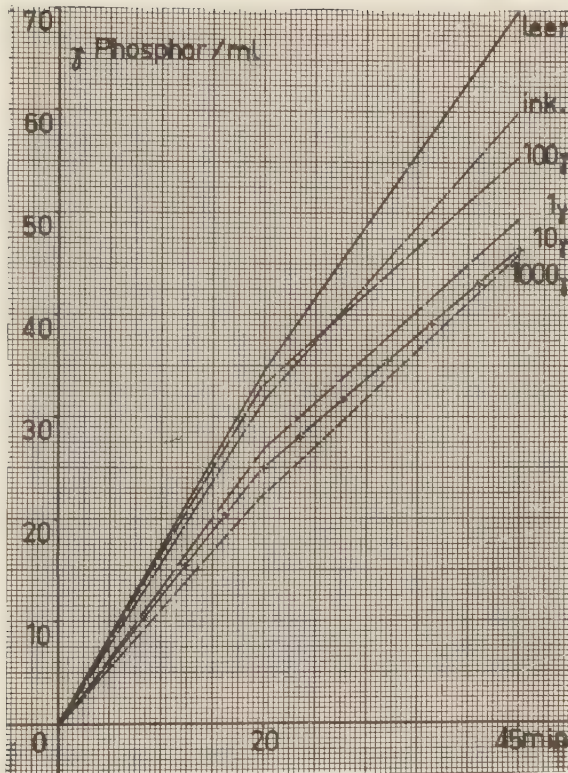


Abb.19: Verlauf von Reaktionskurven unter Zusatz von Proluton.

Tab.11: Durchschnittswerte der spezifischen Aktivität der Homogenate.

Homogenat	γ P/mg N/h	%
ohne Proluton	110 ± 19	100
ohne Prol., ink.	88 ± 29	80
ink. + 1 γ Prol.	77 ± 16	70
ink. + 10 γ Prol.	89 ± 16	81
ink. + 100 γ Prol.	92 ± 14	84
ink. + 1000 γ Prol.	61 ± 27	55

Saure Phosphataseaktivität in Schweine-Hypophyse

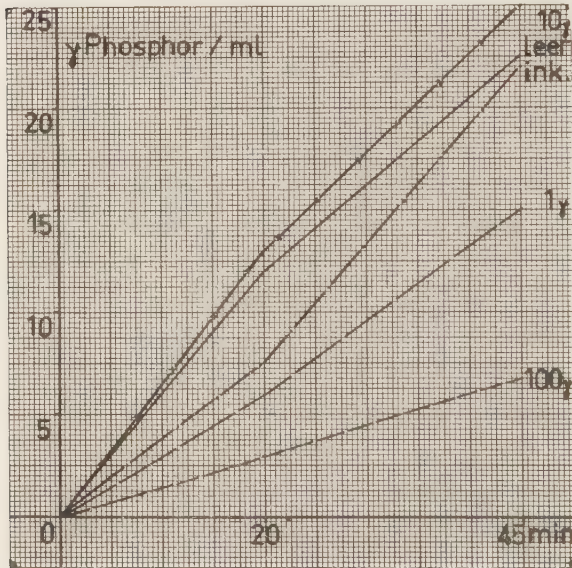


Abb.20: Verlauf von Reaktionskurven unter Zusatz von Progynon.

Tab.12: Durchschnittswerte der spezifischen Aktivität der Homogenate

Homogenat	γ P/mg N/h	%
ohne Progynon	48 ± 9	100
ohne Prog., ink.	50 ± 13	104
ink. + 1γ Prog.	44 ± 14	92
ink. + 10γ Prog.	55 ± 4	115
ink. + 100γ Prog.	10 ± 3	21

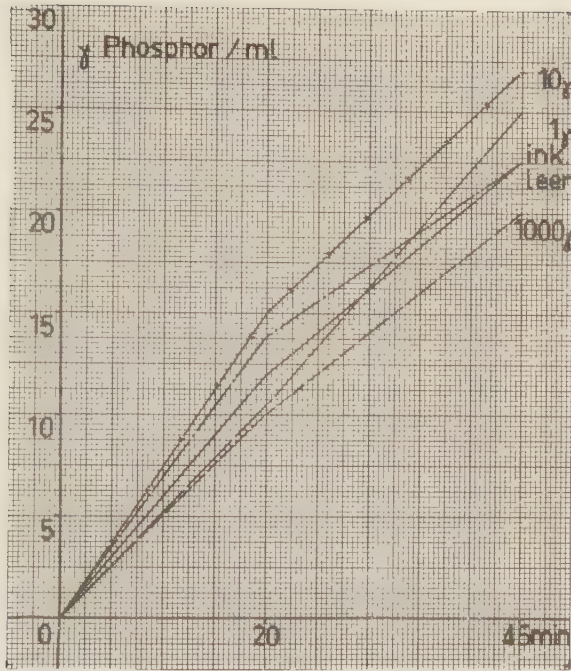


Abb.21: Verlauf von Reaktionskurven unter Zusatz von Proluton.

Tab.13: Durchschnittswerte der spezifischen Aktivität der Homogenate.

Homogenat	γ P/mg N/h	%
ohne Proluton	48 ± 9	100
ohne Prol., ink.	50 ± 13	104
ink. + 1γ Prol.	51 ± 9	106
ink. + 10γ Prol.	57 ± 3	119
ink. + 100γ Prol.	56 ± 6	117
ink. + 1000γ Prol.	44 ± 4	92

c) Auswertung

Hormon	PROGYNON						PROLUTON					
	Hoden		Nebenhiere		Hypophyse		Hoden		Nebenhiere		Hypophyse	
ohne	204	100	110	100	48	100	204	100	110	100	48	100
ohne, ink.	208	102	88	80	50	104	208	102	88	80	50	104
ink. + 1g	195	96	61	55	44	92	181	89	77	70	51	106
ink. + 10g	183	90	93	85	55	115	165	81	89	81	57	119
ink. + 100g	72	35	45	41	10	21	165	81	92	84	56	117
ink. + 1000g							157	77	61	55	44	92
	YP	%	YP	%	YP	%	YP	%	YP	%	YP	%

Tab. 14: Vergleich der sauren Phosphataseaktivität unter Zusatz von Progynon und Proluton.

Zu Tabelle 14:

Unsere Versuche, die wir mit zusätzlichen Effektoren (0,1 m $MgCl_2$ und 0,1 m $CaCl_2$) durchführten, hatten keinen Einfluß auf die Aktivität der sauren Phosphatase, so daß wir ihre Ergebnisse bei der Berechnung der spezifischen Aktivität mit verwendeten, da sie innerhalb der Streubreite der einzelnen Paralleluntersuchungen lagen.

Entsprechend den Angaben in der Literatur, daß in den der Fortpflanzung dienenden Organen, in Endometrium, Prostata (43) und Samenblasen, eine sehr aktive saure Phosphatase vorkommt, finden wir die höchste Aktivität bei den von uns untersuchten Organen im Hoden. Im Vergleich dazu ist in Nebennieren- nur etwa die Hälfte und in Hypophysenhomogenat nur etwa ein Viertel der sauren Phosphataseaktivität des Hodenhomogenats nachweisbar.

Hoden und Nebenniere zeigen bei Zugabe sowohl von "Progynon" als auch von "Proluton" keinerlei Aktivierung der sauren Phosphatase. Ganz allmählich nimmt die saure Phosphataseaktivität dieser Organe unter steigenden Hormonkonzentrationen ab. Die Aktivität der Nebenniere wird, ebenso wie die Kathepsinaktivität der Nebenniere, schon durch Inkubation gehemmt.

Die saure Phosphatase scheint gegen Östrogen bzw. gegen das Lösungsmittel nicht so empfindlich zu sein wie das Kathepsin. Jedenfalls erfolgt bei der Zugabe von 100 γ Progynon je Versuchsansatz keine absolute Hemmung. Aber es ist eine deutliche Inhibierung zu beobachten, die am stärksten beim Hypophysenhomogenat in Erscheinung tritt.

Nach den Versuchen mit reinem Lösungsmittel zu urteilen, muß auch hier das Ergebnis auf die Wirkung desselben zurückgeführt werden: Es tritt bei allen drei Organen eine nahezu absolute Hemmung auf. Ebenso zeigen die Versuchsansätze mit dem Verdünnungsmittel des "Prolutons" Aktivitätsverluste gegenüber den ohne Hormon durchgeführten Versuchen.

Als ein Beweis für die Organspezifität von Enzymen könnte gelten, daß die Verhältnisse bei der Hypophyse anders liegen als bei Hoden und Nebenniere. Denn hier machen sich durch beide Eierstockshormone aktivierende Einflüsse auf die saure Phosphatase bemerkbar. Wenn die Hormonkonzentrationen aber sehr hoch (100 γ "Progynon", 1000 γ "Proluton" und - abgesehen vom Lösungsmittel - sicher unphysiolo-

gisch werden, reagiert das Ferment mit einer Inhibierung.

Die Berechnung der Werte in γ P/mg N/h aus den Extinktionswerten bei so niedrigen Aktivitäten (Hypophyse) ergibt aber selbstverständlich ein eindrucksvolleres Bild, weil damit die Unterschiede stärker in Erscheinung treten. Z.B. liegen die Extinktionen von Versuchsansätzen ohne Hormonzugabe gegenüber solchen mit 10γ "Progynon" durchschnittlich nur um 0.005 auseinander. Bei Berechnung auf γ P/mg N/h und auf %-Werte entstehen die großen Differenzen.

Zusammenfassend können wir also sagen, daß die saure Phosphatase bei unseren Versuchen in vitro in Hoden- und Nebennierenhomogenat durch das verwendete "Progynon" und "Proluton" gehemmt, dagegen in der Hypophyse durch beide aktiviert wurde.

3.) Alkalische Phosphatase

a) Vorarbeiten

Die Vorarbeiten wurden entsprechend denen bei saurer Phosphatase durchgeführt.

1. Untersuchungen mit Placentagewebe:

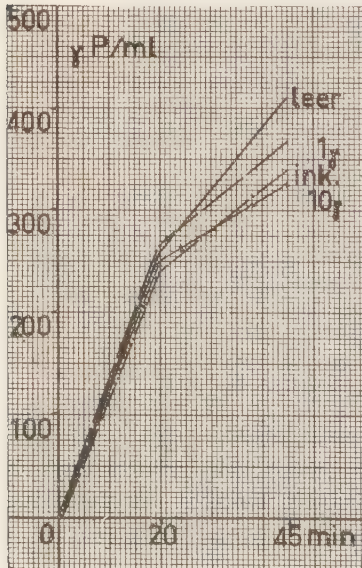


Abb. 22

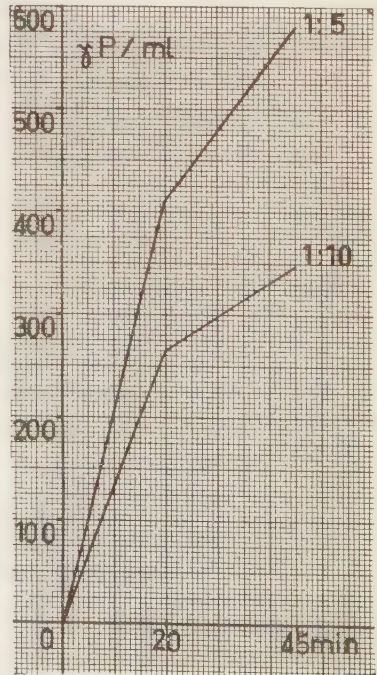


Abb. 23

Zu Abb.22: Aktivität der alkalischen Phosphatase in der menschlichen Placenta (1:10) unter Einwirkung von "Progynon".

Zu Abb.23: Alkalische Phosphataseaktivität in der menschlichen Placenta.

3. Suche nach den optimalen Homogenatverdünnungen:

Ebenso wie die Aktivität der sauren Phosphatase war uns auch die der alkalischen in Hoden, Nebenniere und Hypophyse unbekannt, und wir versuchten wieder, zunächst mit den optimalen Konzentrationen für die Aktivität der Proteasen zu arbeiten.

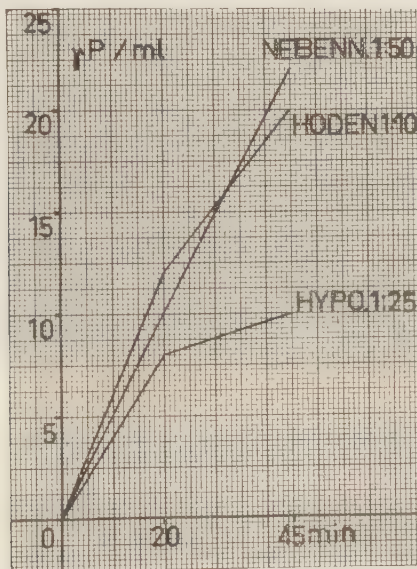


Abb.24: Aktivität der alkalischen Phosphatase in Hoden, Nebenniere und Hypophyse.

Es zeigte sich, daß diese Konzentrationen zu niedrig gewählt waren. Deshalb arbeiteten wir mit folgenden Verdünnungen der 33,3 % igen Homogenate:

Hoden	1 : 5
Nebenniere	1 : 10
Hypophyse	1 : 5

b) Ergebnisse

Alkalische Phosphataseaktivität in Bullenhoden

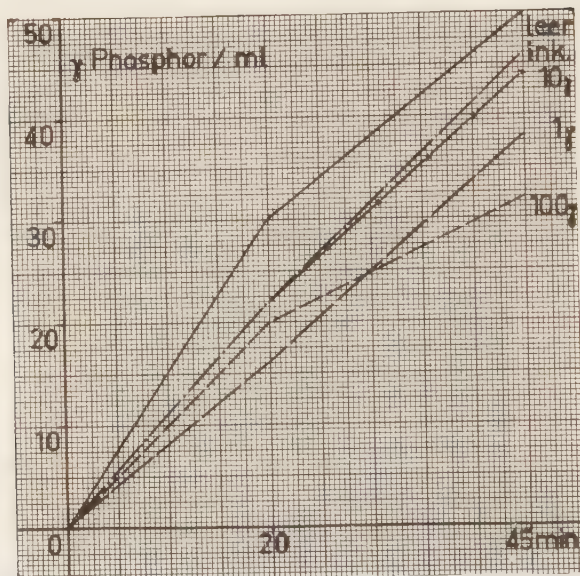


Abb.25: Verlauf von Reaktionskurven unter Zusatz von Progynon.

Tab.15: Durchschnittswerte der spezifischen Aktivität der Homogenate.

Homogenat	γ P/mg N/h	%
ohne Progynon	73 ± 33	100
ohne Prog., ink.	72 ± 11	99
ink. + 1γ Prog.	55 ± 3	75
ink. + 10γ Prog.	62 ± 16	85
ink. + 100γ Prog.	51 ± 21	70

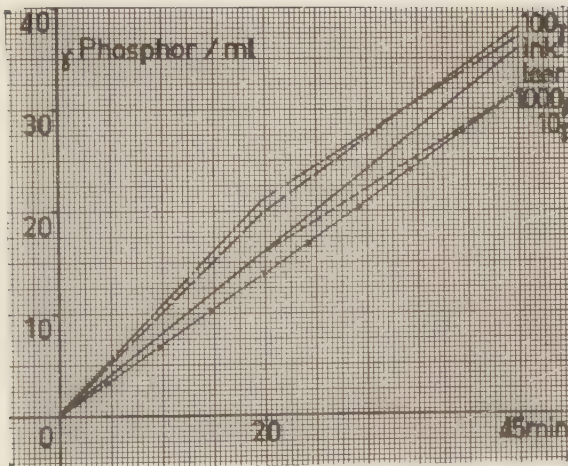


Abb.26: Verlauf von Reaktionskurven unter Zusatz von Proluton.

Tab.16: Durchschnittswerte der spezifischen Aktivität der Homogenate.

Homogenat	γ P/mg N/h	%
ohne Proluton	73 ± 33	100
ohne Prol., ink.	72 ± 11	99
ink. + 1 γ Prol.	69 ± 29	95
ink. + 10 γ Prol.	64 ± 25	88
ink. + 100 γ Prol.	63 ± 19	86
ink. + 1000 γ Prol.	65 ± 27	89

Alkalische Phosphataseaktivität in Schweine-Nebenniere

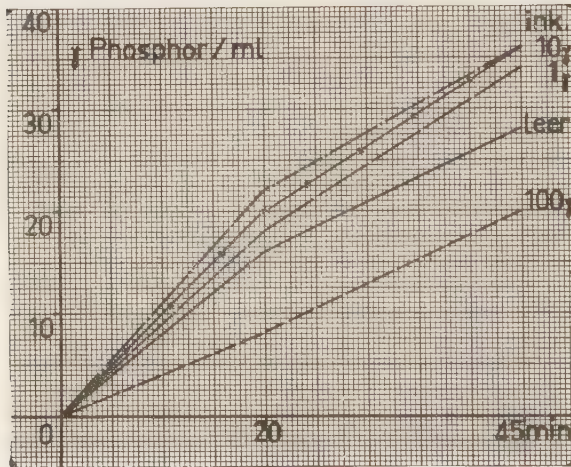


Abb.27: Verlauf von Reaktionskurven unter Zusatz von Progynon.

Tab.17: Durchschnittswerte der spezifischen Aktivität der Homogenate.

Homogenat	γ P/mg N/h	%
ohne Progynon	90 ± 21	100
ohne Prog., ink.	90 ± 21	100
ink. + 1γ Prog.	82 ± 3	91
ink. + 10γ Prog.	74 ± 19	82
ink. + 100γ Prog.	55 ± 13	61

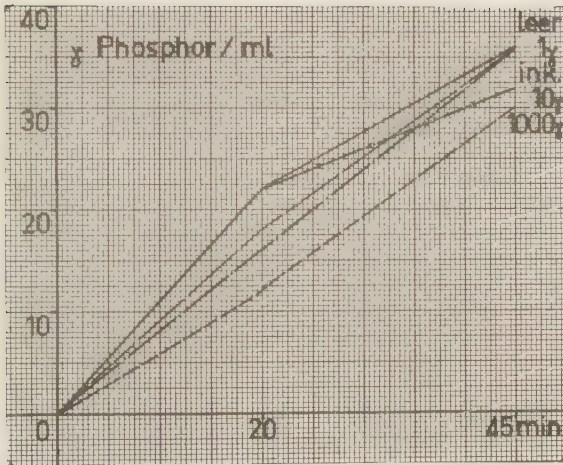


Abb.28: Verlauf von Reaktionskurven unter Zusatz von Proluton.

Tab.18: Durchschnittswerte der spezifischen Aktivität der Homogenate.

Homogenat	γ P/mg N/h	%
ohne Proluton	90 ± 21	100
ohne Prol., ink.	90 ± 21	100
ink. + 1 γ Prol.	82 ± 10	91
ink. + 10 γ Prol.	91 ± 30	101
ink. + 100 γ Prol.	77 ± 34	86
ink. + 1000 γ Prol.	75 ± 22	83

Alkalische Phosphataseaktivität in Schweine-Hypophyse

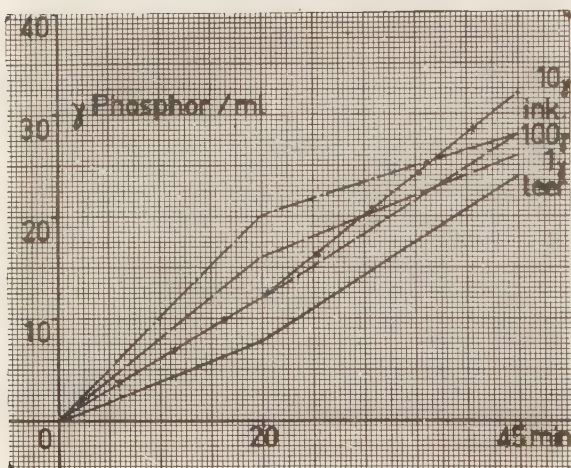


Abb.29: Verlauf von Reaktionskurven unter Zusatz von Progynon.

Tab.19: Durchschnittswerte der spezifischen Aktivität der Homogenate.

Homogenat	γ P/mg N/h	%
ohne Progynon	41 ± 9	100
ohne Prog., ink.	51 ± 11	124
ink. + 1 γ Prog.	49 ± 3	120
ink. + 10 γ Prog.	49 ± 3	120
ink. + 100 γ Prog.	45 ± 19	110

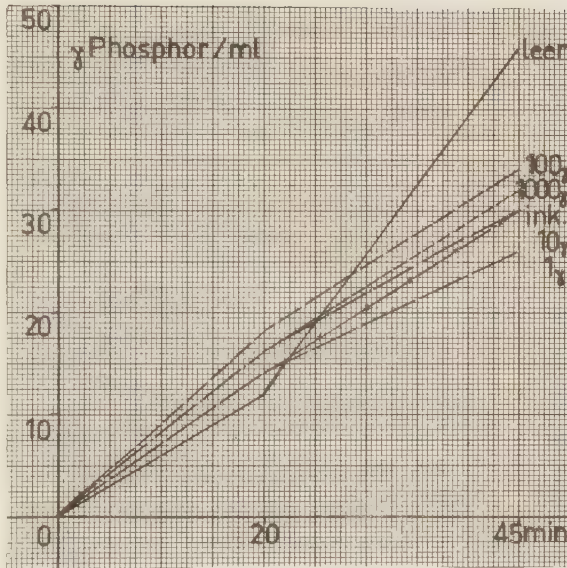


Abb.30: Verlauf von Reaktionskurven unter Zusatz von Proluton.

Tab.20: Durchschnittswerte der spezifischen Aktivität der Homogenate.

Homogenat	γ P/mg N/h	%
ohne Proluton	41 ± 9	100
ohne Prol., ink.	51 ± 11	124
ink. + 1 γ Prol.	57 ± 3	139
ink. + 10 γ Prol.	47 ± 11	117
ink. + 100 γ Prol.	54 ± 22	132
ink. + 1000 γ Prol.	47 ± 21	117

c) Auswertung

Hormon	PROGYNON						PROLUTION					
	Hoden		Nebenniere		Hypophyse		Hoden		Nebenniere		Hypophyse	
ohne	73	100	90	100	41	100	73	100	90	100	41	100
ohne, ink.	72	99	90	100	51	124	72	99	90	100	51	124
ink.+ 1g	55	75	82	91	49	120	69	95	82	91	57	139
ink.+ 10g	62	85	74	82	49	120	64	88	91	101	47	117
ink.+ 100g	51	70	55	61	45	110	63	86	77	86	54	132
ink.+1000g							65	89	75	83	47	117
	gP	%	gP	%	gP	%	gP	%	gP	%	gP	%

Tab.21: Vergleich der alkalischen Phosphataseaktivität unter Zusatz von Progynon und Proluton.

Zu Tabelle 21:

In allen drei von uns untersuchten Organen konnte alkalische Phosphatase nachgewiesen werden, ihre Aktivität in den einzelnen Organen ist aber geringer als die der sauren Phosphatase. Im Vergleich zu dieser beträgt die alkalische Phosphataseaktivität im Hoden nur etwa ein Drittel, in den beiden anderen Organen ist sie um etwa 10 - 20 % geringer. Die stärkste Aktivität finden wir in der Nebenniere, die schwächste in der Hypophyse.

Die Ergebnisse mit Hypophysenhomogenat müssen mit Vorbehalt betrachtet werden. Einige Parallelversuche konnten gar nicht ausgewertet werden. Vielleicht liegen die ungenügenden Ergebnisse nach Zusatz der Ovarialhormone daran, daß die Aktivität an sich sehr niedrig ist (für die Berechnung der Werte in γ Phosphat/mg N/h gilt das schon für die saure Phosphatase der Hypophyse auf Seite 42 oben Gesagte). Auffällig ist weiterhin in der Hypophyse der große Unterschied zwischen der Aktivität der nichtinkubierten Ansätze, die gleich 100 % gesetzt wurde, im Vergleich zur Aktivität der inkubierten Ansätze. Ein solcher Unterschied wurde nie vorher gefunden, und gerade bei der alkalischen Phosphataseaktivität der beiden anderen Organe sind diese Werte etwa gleich groß. - Aus anderen Arbeiten unseres Laboratoriums ist bekannt, daß bei der Zellfraktionierung erhebliche Verluste der alkalischen Phosphatase der Hypophyse auftreten (STÜTZEL, persönliche Mitteilung). Eine Ursache für diese Aktivitätsveränderung konnte bislang nicht gefunden werden. Wahrscheinlich trugen die schnellen autolytischen Vorgänge an der Hypophyse dazu bei, daß die Untersuchung Schwierigkeiten bereitete.

Ebenso wie schon die saure Phosphatase zeigte auch die alkalische in Hoden und Nebenniere durch Ovarialhormone eine Inhibierung. Die alkalische Phosphataseaktivität nimmt mit steigenden "Progynon"- und "Proluton"-Konzentrationen ab.

Die Empfindlichkeit gegen einen Hormonzusatz von 100 γ "Progynon" scheint noch weniger ausgeprägt zu sein, denn die Hemmung ist viel schwächer als bei der sauren Phosphatase (vgl. Tabelle 14). Die Lösungsmittelversuche stehen damit in Einklang, d.h. bei Zugabe der Flüssigkeitsmengen, die 100 γ "Progynon" und 1000 γ "Proluton" entsprechen, tritt jeweils etwa der gleiche Prozentsatz an Hemmung auf.

die saure, sie wird durch Östrogen und Progesteron aktiviert, sogar bei hohen Hormonkonzentrationen. Ähnlich verhalten sich interessanterweise die Lösungsmittelversuche. Allerdings ergibt sich ein erheblicher Aktivierungseffekt durch die Inkubation, der dann bei Zusatz von Hormon ("Progynon") wieder etwas zurückgeht.

Wir können also sagen: Die alkalische Phosphatase in den endokrinen Organen Hoden und Nebenniere wird durch "Progynon" und "Pro-luton" gehemmt, dagegen im übergeordneten Organ Hypophyse aktiviert.

E . D I S K U S S I O N

Bei allen von uns untersuchten Organen liegen die gefundenen Werte für die Kathepsinaktivität in der Größenordnung der von NÜSSLEIN bei pH = 3,5 gemessenen Werte (38). Die Nebenniere zeigt eine besonders hohe Aktivität (2636 γ Tyrosin/mg N/h). Dieser Aktivität am nächsten ist die von JUNG gemessene spezifische Aktivität der Proteinase bei pH = 3,5 im Gesamtovargewebe (1134 γ Tyrosin/mg N/h); die spezifische Aktivität im Hoden beträgt nur etwa die Hälfte dieser Aktivität (634 γ Tyrosin/mg N/h).

Die plötzlich einsetzende, sehr starke Hemmung der Aktivitäten bei Zusatz von 100 γ "Progynon" bzw. 1000 γ "Proluton" konnte auf die Gegenwart der alkoholischen Lösungsmittel zurückgeführt werden. Abgesehen davon konnte in Hoden und Nebenniere bei Zusatz beider Hormonlösungen kein Aktivitätsanstieg beobachtet werden. Damit können wir die Versuche von DIRSCHERL (16) und JUNG und KEMMLER (28, 29) bestätigen und die in vivo gewonnenen Ergebnisse am Endometrium von FUHRMANN (20) und STARK und VORHERR (45) biochemisch belegen.

Allerdings konnte ein Aktivitätsanstieg in den Fermentansätzen beobachtet werden, bei denen Hypophysenhomogenat als Enzymlösung verwendet wurde. Als Ursache für diese Aktivierung kommt unserer Ansicht nach die Organspezifität von Enzymen in Frage. Es muß angenommen werden, daß die Hypophyse ein anderes Enzymmuster besitzt als die ebenfalls untersuchten Organe.

Die Phosphatasen zeigen Aktivitäten, die in der Größenordnung denen anderer Organe entsprechen.

Als direkte Vergleichswerte stehen uns nur die Ergebnisse von MELCHIOR und MICUTA (37) mit Hypophyse zur Verfügung, die leider mit anderen Arbeitsmethoden und pH-Werten gewonnen wurden. Ein Vergleich mit unseren Ergebnissen zeigt jedoch, daß die Phosphataseaktivitäten der Hypophyse, verglichen mit denen der anderen untersuchten Organe, auch am niedrigsten sind.

Einen Teil der Ergebnisse von MELCHIOR und MICUTA können wir nicht bestätigen: Die Aktivierung der alkalischen Phosphatase in der Rattenhypophyse nach Behandlung mit Diäthylstilböstrol in vivo läßt sich an der Schweinehypophyse, mit der wir arbeiteten, in vitro

bestätigen. Die Hemmung der sauren Phosphatase, wie sie die Autoren beobachteten, läßt sich dagegen in vitro an der Schweinehypophyse nicht feststellen, Hier kommt es vielmehr auch zu einer Aktivitätszunahme.

Die Phosphatasen im Bullenhoden unterscheiden sich in der Höhe der Aktivitäten und in der Verteilung nicht wesentlich von den Werten in anderen männlichen und weiblichen Genitalorganen. Im Endometrium (36) und ebenso in Prostata (43) und Samenblasen kommt eine sehr aktive saure Phosphatase vor. Folgende Werte geben gute Vergleichsmöglichkeiten, da sie nach denselben Arbeitsbedingungen gefunden wurden wie die unseren. Z.B. konnte KIDESS (31) im Corpus luteum eine saure Phosphatase nachweisen, deren Aktivität fast viermal so hoch wie die der alkalischen ist ($400 \mu\text{g Phosphat/h/ml Homogenat}$ gegenüber $99 \mu\text{g Phosphat/h/ml Homogenat}$). Eine ähnliche Verteilung findet JUNG (27) für die Phosphatasen im Ovar ($135 \mu\text{g Phosphat/mg N/h}$ gegenüber $60 \mu\text{g Phosphat/mg N/h}$).

Dementsprechend finden wir im Hoden die höchste Aktivität der sauren Phosphatase in den von uns untersuchten Organen ($204 \mu\text{g Phosphat/mg N/h}$), die fast dreimal so groß wie die der alkalischen ist ($73 \mu\text{g Phosphat/mg N/h}$), sie ist damit etwas höher als die in der Bullenprostata gemessene Aktivität (43). Dieses Ergebnis scheint uns ein weiterer Punkt für die Diskussion der Frage zu sein, ob der sauren Phosphatase eine biologische Funktion im Befruchtungsvorgang zuzuschreiben ist.

Dagegen finden STARK und W. JUNG (44) in der Placenta - ähnlich wie wir bei unseren Vorarbeiten - eine sehr aktive alkalische Phosphatase und eine um die Hälfte schwächere saure Phosphatase. Die Aktivität der Phosphatasen im Ovar ist im übrigen niedriger als in der Placenta (27).

Interessant scheint uns in diesem Zusammenhang die histochemische Darstellung von MC KAY und Mitarbeitern zu sein (35). Sie konnten im Corpus luteum eine übermäßige alkalische Phosphataseaktivität feststellen. Im Corpus luteum graviditatis fanden sie das Enzym in erhöhtem Maße, die saure Phosphatase dagegen in etwa gleicher Menge wie in normalem Corpus luteum. MC KAY und Mitarbeiter vermuten, daß ein Zusammenhang zwischen alkalischem Phosphatasespiegel (und anderen von ihnen nachgewiesenen Enzymen) und der Produktion steroider Substanzen besteht.

So findet OBER im Ovar vor allem in den Drüsenzellen, die Steroidhormone bilden, alkalische Phosphatase (39).

Wir konnten jedoch in der Nebenniere, die bekanntlich auch Steroidhormone produziert, keine übermäßig starke alkalische Phosphatase feststellen, ja wir finden sogar eine niedrigere alkalische als saure Phosphatase ($90 \mu\text{Phosphat/mg N/h}$ und $110 \mu\text{Phosphat/mg N/h}$). COX und MC LEOD (14) konnten interessanterweise durch Prednisolon eine Erhöhung der alkalischen Phosphatase in menschlichen Gewebekulturen nachweisen.

Während FUHRMANN nach den Ergebnissen von MELCHIOR und MICUTA und nach seinen Versuchen zu dem Schluß kommt, daß die saure Phosphatase ganz allgemein mehr dem Einfluß des Progesterons unterliegt, sind wir wie BURGER der Meinung, daß nicht von einem Versuchsergebnis auf das gleichartige Verhalten desselben Fermentes in anderen Organen geschlossen werden kann. Wir können jedenfalls seine Ergebnisse mit unseren Versuchen nicht bestätigen: In Hoden und Nebenniere erhielten wir durch Östrogen- und Progesteronbeeinflussung nur Inhibierungen, während wir in der Hypophyse durch beide Hormone eine Aktivierung finden.

Nach histochemischen Arbeiten gilt allgemein im Bereich des (weiblichen) Genitale für die alkalische Phosphatase, daß sie durch Östrogen aktiviert und durch Progesteron gehemmt wird, also etwa umgekehrt von den Ovarialhormonen beeinflusst wird wie die saure Phosphatase. Durch unsere in vitro-Versuche an Hoden, Nebenniere und Hypophyse können wir diese Untersuchungen nicht verallgemeinern, vielmehr müssen wir wieder sagen, daß Inhibierung oder Aktivierung vom entsprechenden Organ abhängig ist. Ebenso wie bei Kathepsin und saurer Phosphatase reagieren Hoden und Nebenniere auf die Beeinflussung durch Ovarialhormone mit einer Hemmung der alkalischen Phosphataseaktivität, womit wir die Versuche von ALDMAN und Mitarbeitern mit Niere bestätigen können (4); die Hypophyse zeigt eine starke Aktivierung.

DIRSCHERL faßt in einem seiner Vorträge (15) zusammen, daß allgemein für Effektoren, und so auch für Steroide, gilt, daß Inhibierungen viel häufiger als Aktivierungen auftreten. Unsre Ergebnisse sind ein Beispiel dafür. Auszunehmen ist die Hypophyse, die eine Sonderstellung innerhalb des endokrinen Systems einnimmt.

F Z U S A M M E N F A S S U N G

In der vorliegenden Arbeit wurde die Einwirkung von "Progynon" und "Proluton" auf Fermente in Hoder (Bulle), Nebenniere und Hypophyse (Schwein) untersucht.

Zunächst wurde im Literaturteil eine kurze Charakteristik der Fermente und Hormone gegeben mit besonderer Berücksichtigung ihrer gegenseitigen Beeinflußbarkeit und ein Überblick über bisherige Ergebnisse beim Einfluß von Ovarialhormonen auf die von uns untersuchten Enzyme. Es folgte eine Beschreibung der Arbeitsmethoden.

Mit der Methode nach ANSON wurde die proteolytische Aktivität mit Hämoglobin als Substrat bei pH = 3,5 in den Enzymlösungen untersucht. Die Bestimmung der sauren Phosphatase erfolgte nach der Methode von HUDSON und LONDON bei pH = 5,0, die der alkalischen nach den Angaben von JENNER und KAY bei pH = 9,0, in beiden Fällen wurde $\text{Na}_2\text{-}\beta\text{-Glycerophosphat}$ als Substrat verwendet.

Bei in vitro-Versuchen konnten die genannten Fermente in allen drei Organen nachgewiesen werden. Zusatz der Hormonlösungen in steigenden Konzentrationen von 1 μ bis 100 bzw. 1000 μ je Versuchsansatz brachte in den Homogenaten von Hoden und Nebenniere in keinem Falle eine Aktivierung, sondern meist eine zunehmende Inhibierung. Die Fermente der Hypophyse dagegen wurden in allen Fällen sowohl durch "Progynon" als auch durch "Proluton" aktiviert.

Die gemessenen starken Aktivitätsrückgänge bei Zusatz von 100 μ "Progynon" bzw. 1000 μ "Proluton" wurden auf die Wirkung der alkoholischen Lösungsmittel zurückgeführt, deren Testung diese Annahme bestätigte. Daraus resultiert, daß in keinem der Versuche ein Effekt angenommen werden kann, der allein durch Follikel- oder Gelbkörperhormon bedingt ist.

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen wurden graphisch dargestellt. Die in den Tabellen angegebenen Werte sind das Mittel der aus den Meßergebnissen errechneten Stundenwerte. Die Ergebnisse wurden diskutiert.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- 1 Abderhalden, R. Klinische Enzymologie
 Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1958).

- 2 Abderhalden, E., Untersuchungen des Wirkungsbereichs der
 Schwab, E. während der Autolyse von Organen in Er-
 scheinung tretenden Fermente der Gruppe
 der Proteinasen und der Polypeptidasen.
 Fermentforschung 14, 43 (1935).

- 3 Adams, E. Proteolytic activity of pituitary extracts.
 Fed. Proc. 10, 153 (1951).

- 4 Aldman, B. E., Dicz- Inhibition of Alkaline Phosphatase by
 falusy, E., Högberg, Oestradiol Phosphates.
 B., Rosenberg, T. Biochem. J. 49, 218 (1951).

- 5 Ammon, R., und Dir- Fermente, Hormone, Vitamine und die Bezie-
 scherl, W. hungen dieser Wirkstoffe zueinander.
 Band I, II
 Band III noch nicht erschienen
 Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1959).

- 6 Anson, M. L. The estimation of pepsin, trypsin, papain
 and cathepsin with hemoglobin .
 J. Gen. Physiol., 22, 79 (1939).

- 7 Atkinson, W. B Studies of the effect of steroid sex hor-
 mones on alkaline phosphatase in the endo-
 metrium.
 In: Menstruation and its disorders, by
 Engle, E. T.
 Thomas Springfield, Ill. 1950, p. 3.

- 8 Atkinson, W. B., and Effect of steroid sex hormones on distri-
 Elftman, H. bution of alkaline phosphatase in uterus
 of mouse.
 Proc. Soc. exp. Biol., N. Y. 62, 148 (1946)

- 9 Atkinson, W. B., and Mobilization of alkaline phosphatase in
Elftman, H. the uterus of mouse by Oestrogen.
 Endocrinology 40, 30 (1947).

- 10 Atkinson, W. B., and Studies on endometrial alkaline phosphatase during the human menstrual cycle and
Engle, E. T. in the hormon treated monkey.
 Endocrinology 40, 327 (1947).

- 11 Beet, A. E. Potassium permanganate in the Kjeldahl
 Method for the determination of nitrogen
 in organic substances.
 Nature 175, 513 (1955).

- 12 Bradley, H. C., Autolysis of Adrenal Gland Tissue.
Belfer, S. J. Biol. Chem. 124, 331 (1938).

- 13 Burger, H. Untersuchungen über das Verhalten der alkalischen und sauren Serumphosphatase im
 Verlauf des Menstruationszyklus und unter
 Hormoneinfluß.
 Arch. Gynäk. 191, 134 (1958/59).

- 14 Cox, Hormonale Induktion von alkalischer Phosphatase in menschlichen Zellen in Gewebekultur.
McLeod Nature (London), 190, 85 (1961).

- 15 Dirscherl, W. Einwirkungen von Steroidhormonen auf Enzyme und Enzymsysteme.
 Vortrag auf dem IV. Intern. Kongreß für Biochemie, Wien 1958.
 Symposium Nr. IV., Vortrag Nr. 7.

- 16 Dirscherl, W. Über die Einwirkung von Steroidhormonen auf Gewebsstoffwechsel und Fermente.
 Erg, Physiol. 48, 111 (1955).

- 17 Flaschenträger, B.. Physiologische Chemie
Lehnartz, E. Ein Lehr- und Handbuch, Band I
 Berlin-Göttingen-Heidelberg, Springer-Verlag 1951

- 18 Folin, O., and Cio-
calteau, V. On tyrosine and tryptophane determinations
in proteins.
J. biol. Chem. 73, 627 (1927).
- 19 Fuhrmann, K. Hormone und Fermente des Endometriums.
Gynaecologia 152, 1 (1961).
- 20 Fuhrmann, K. Über die Endopeptidaseaktivität (Kathep-
sinkomplex) des Endometriums und anderer
Gewebe weiblicher Genitalorgane.
Zschr. f. Geb.hilfe und Gynäk. 154, 168 (1960).
- 21 Fuhrmann, K. Über die Wirkung der Sexualhormone auf die
eiweißspaltenden Fermente der Uterusmus-
kulatur.
Zschr. Geburtsh. 155, 12 (1960).
- 22 Gomori, G. Microtechnical demonstration of phosphatase
in tissue sections.
Proc. Soc. exp. Biol., N.Y. 42, 23 (1939).
- 23 Hoffmann-Osten-
hoff, O. Enzymologie
Wien: Springer 1954.
- 24 Hudson, B. P.,
London, M. Studies on the purifications of acid pros-
tatic phosphatase.
Arch. Biochem. 46, 141 (1953).
- 25 Jenner, H. D.,
H. D. Kay In: Hoppe-Seyler/Thierfelder
Handbuch der physiologisch- und patholo-
gisch-chemischen Analyse.
Band V, S. 176.
Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer-
Verlag 1953.
- 26 Jones, H. W. jr.,
Wade, R., and
Goldberg, B. Biochemical and histochemical alkaline
Glycerophosphatase in normal endometrium,
endometrial hyperplasie and adeno-Ca.
Amer. J. Obstet. Gynec. 64, 1364 (1952).
- 27 Jung, G. Untersuchungen über proteolytische Enzyme
des Ovarium.
Habilitationsschrift 1962

- 28 Jung, G., und
E. Kemmler Der Einfluß von gonadotropen Hormonen
und Steroidhormonen auf proteolytische
Enzyme des Liquor folliculi.
Nicht veröffentlicht.
- 29 Jung, G., und
E. Kemmler Proteolytische Enzyme des Corpus luteum
und ihre Beeinflussung durch Ovarialhor-
mone und Gonadotropine.
Nicht veröffentlicht.
- 30 Jung, G., und
G. Nüsslein Untersuchungen über proteolytische Enzyme
in endokrinen Organen.
Endokrinologie, z.Zt. im Druck.
- 31 Kidess, A. Untersuchungen über proteolytische Enzy-
me und Phosphatasen im Corpus Rubrum und
Corpus Luteum vom Schwein.
Inaugural-Dissertation, Tübingen 1962
- 32 Lang, K., und
G. Siebert Aufarbeitung von Gewebe und Zellen.
In: Hoppe-Seyler/Thierfelder
Handbuch der physiologisch- und patholo-
gisch-chemischen Analyse.
Band II, Teil 2, S. 537.
Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer-
Verlag, 1955.
- 33 Lehnartz, E. Einführung in die chemische Physiologie
Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidel-
berg 1959.
- 34 Lohmann, K., und
L. Jendrassik Kolorimetrische Phosphorsäure-Bestimmung
im Muskelextrakt.
Biochem. Ztschr. 178, 419 (1926).
- 35 Mc Kay, G. D.,
J.H.M. Pinkerton,
A.T. Hertig, and
W. Danziger The adult human ovary: A histochemical
study.
Obstet. Gynec. 18, 13 (1961).

- 36 Mc Kay, G.D.,
Hertig, A.T.,
Bardavil, W.A.,
and Velardo, J.H. Histochemical observations on the endometrium. I. Normal endometrium. Obstet. Gynec. N.Y. 8, 140 (1956).
- 37 Melchior, J.B.,
and Micuta, B.S. Effects of administration of oestrogens upon enzymes of rat pituitary. I. β -Glucuronidase and phosphatases. Cancer Res. 16, 20 (1956).
- 38 Müßlein, G. Vergleich der proteolytischen Aktivität endokriner Organe unter Berücksichtigung des Eigenabbaus. Inaugural-Dissertation, Tübingen 1961.
- 39 Ober, K. G. Die wechselnde Aktivität der alkalischen Phosphatase im Endometrium und Ovar während des mensuellen Zyklus sowie im Myometrium unter der Geburt. Eine histochemische Darstellung. Klin. Wschr. 28, 9 (1950).
- 40 Ober, K. G.,
und Weber, M. Beitrag zur Progesteronwirkung. Klin. Wschr. 29, 53 (1951).
- 41 Purr, A. Über die Aktivierung des Kathepsins und Papains durch Follikelhormon. Biochem. Zschr. 320, 74 (1949).
- 42 Selye, H. Textbook of Endocrinology, 2nd Edition. S. 610, 96, 208. Montreal, Canada (1949).
- 43 Siebert, G.,
Jung, G., und
K. Lang Intrazelluläre Verteilung von saurer Phosphatase in der Bullenprostate. Biochem. Zschr. 326, 464 (1955).
- 44 Stark, G., Jung, W. Phosphatasen in den Zellstrukturen der Placenta bei pathologischen Schwangerschaften. Arch. Gynäk. 191, 437 (1959).

- 45 Stark, G.,
Vorherr, H. Kathepsinaktivität im menschlichen Endo-
metrium.
Klin. Wschr. 33, 623 (1955).
- 46 Takamatsu, H. Trans. jap. path. Soc. 29, 492 (1939);
Zit.: Majno, G., und Rouiller, C.: Die
alkalische Phosphatase in der Biologie
des Knochengewebes.
Virchows Arch. 321, 1 (1951).
- 47 Villee, Claude, A. Die Beeinflussung von Enzymen in Uterus
und Placenta durch Östrogene.
Klin. Wschr. 39, 173 (1961).
- 48 Yamanaka, K. The Serum Phosphatase Level in Healthy
Women and its Fluctuations Accompanying
the Sexual Cycle.
J. Jap. obstet. Gynaec. Soc. 1, 190(1954).

Lebenslauf

Am 23. April 1939 wurde ich, Gertraude K ä h l i n g , in Freiberg/Sa. als Tochter des Studienrates Erhard Kähling und seiner Ehefrau Martha, geb. Viola, geboren. In Freiberg besuchte ich die "Oberschule Geschwister Scholl" bis zum Abschluß der 11. Klasse.

Nach Übersiedlung nach Stuttgart bestand ich im Februar 1958 am "Königin-Olga-Stift" das Abitur.

Im Sommersemester 1958 begann ich, in Tübingen Medizin zu studieren, und machte im Frühjahr 1959 das Vorphysikum. Zum Wintersemester 1959/60 ging ich an die Universität Hamburg und legte im März 1961 die Ärztliche Vorprüfung ab. Die klinischen Semester studierte ich in Bonn und in Tübingen. In Tübingen beendete ich im Dezember 1964 mein Studium mit dem Medizinischen Staatsexamen.

